



João Pedro Pestana Spínola

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

Bioplásticos como plataforma de baixo custo para testes de diagnóstico colorimétricos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientadora: Elvira Maria Correia Fortunato, Prof.^a Doutora, FCT-UNL
Co-orientadora: Maria Ascensão Miranda Reis, Prof.^a Doutora, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof.^a Doutora Susana Isabel dos Santos
Silva Sérgio Venceslau

Arguente: Prof.^a Doutora Luísa Alexandra Graça Neves

Vogal: Prof.^a Doutora Maria da Ascensão Miranda Reis



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Outubro, 2018

Bioplastic as a low-cost platform for colorimetric diagnostic tests.

Copyright © 2018 – Todos os direitos reservados. João Pedro Pestana Spínola, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

“O saber não ocupa lugar”

- Ditado Popular

AGRADECIMENTOS

Terminada esta etapa do meu percurso académico, chega à altura de reconhecer as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para o meu sucesso.

Em primeiro lugar gostava de agradecer à minha orientadora de tese, a Professora Elvira Fortunato, e à minha co-orientadora, a Professora Maria Ascensão Reis, pelo voto de confiança e pelo vasto leque de ferramentas que me proporcionaram de forma a atingir os meus objetivos.

À Dra. Filomena Freitas, pela disponibilidade e preocupação que demonstrou desde o início para comigo e para o desenvolvimento do meu projeto. O seu contributo e motivação foram imprescindíveis para o sucesso desta investigação.

À Carolina Marques, por não só ter acompanhado de perto o meu trabalho, mas também pela qualidade das suas sugestões. Um grande obrigado também à Sara Silvestre pela proximidade com o meu projeto e pela ajuda com as diferentes ferramentas de caracterização.

À Ana Rebocho, por me guiar passo por passo no laboratório e por partilhar comigo a sua sabedoria em relação à manipulação de biopolímeros e produção de membranas.

À Diana Araújo, à Patrícia Freitas e ao João Pereira, pelas incríveis discussões e sessões de dúvidas, pela energia com que trabalhavam, e pela forma como pacientemente lidavam com a minha (abundante) ignorância.

Um enorme e especial agradecimento à Beatriz, pela parceria perfeita. A sua amizade foi absolutamente essencial para o meu crescimento, tanto a nível académico como a nível pessoal. Que continuemos a caminhar lado a lado, por muito tempo.

Um especial agradecimento ao Professor Christopher Aurretta, pela energia disponibilizada e pela inspiração que me proporcionou.

Aos amigos que fiz durante estes 6 anos e, principalmente, para os que vão resistir à erosão do tempo. Obrigado por existirem.

Por fim, resta-me agradecer às pessoas que me acompanham desde sempre, e que são as principais responsáveis pelas mágicas oportunidades que me apareceram na vida. Aos meus pais e às minhas irmãs, por sempre acreditarem em mim e por darem o seu melhor para me proporcionarem todas as ferramentas necessárias ao meu sucesso. Apesar da distância, conseguiram sempre contribuir da melhor forma.

RESUMO

Existem várias técnicas de referência para detecção precisa e segura de doenças e agentes patogénicos. No entanto estas técnicas ou requerem preparações de amostras com várias etapas, ou então de métodos de análise dependentes de equipamento de laboratório de custo elevado e de técnicos qualificados (que levem a cabo o procedimento). Quando as circunstâncias são de baixos recursos, como junto das populações que mais necessitam de meios de detecção de doenças, estas técnicas tornam-se impraticáveis. Desta forma, nas últimas duas décadas, investigação e desenvolvimentos no ramo da microfluídica trouxeram inovações na miniaturização, automação e redução dos custos dos métodos de referência dependentes de laboratórios, com o objetivo de produzir dispositivos descartáveis adequados a circunstâncias ambulatoriais de baixos recursos – dispositivos de diagnóstico rápido.

Neste trabalho foram desenvolvidas membranas microfluídicas para detecção colorimétrica de glucose a partir dos biopolímeros poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)) e poli(3-hidroxibutirato-*co*-valerato) (P(3HB-*co*-HV)), com as características de dispositivos de diagnóstico rápido e a vantagem de serem biodegradáveis.

A fabricação destas membranas baseou-se no uso dos biopolímeros para criação de estruturas porosas capazes de transportar líquidos por ação capilar, isto é, sem o recurso a forças exteriores. Testaram-se diferentes metodologias no processo de fabricação, obtendo-se os resultados mais promissores com a técnica de lixiviação com sal, aliada a uma exposição a plasma de oxigénio, como forma de tornar os biopolímeros, - inerentemente hidrofóbicos - em matrizes porosas microfluídicas.

Utilizando as membranas produzidas como substrato, alcançou-se a produção de um biossensor colorimétrico de glucose em soluções aquosas, baseado em reações enzimáticas.

ABSTRACT

There are multiple gold-standard techniques for accurate and reliable detection of diseases that require multistep sample preparation relying on expensive lab material and qualified personal. When on a low resources circumstance, like close to populations that need access to disease detection the most, these techniques become impracticable. In this regard, in the last two decades, investigation and developments in microfluidics brought advances in miniaturization, automation and cost-reduction of the gold-standard, lab-dependent techniques. The final goal is the production of a disposable device adapted to low resources, ambulatory circumstances – a rapid diagnostic test.

In the present work, microfluidic membranes for the colorimetric detection of glucose made from biopolymers poli-3-hydroxybutyrate (P(3HB)) and poli(3-hydroxybutyrate-*co*-valerate) (P(3HB-*co*-HV)) were produced, with the characteristics of a rapid diagnostic test and the advantage of being biodegradable.

The production of these membranes was based on the assembly of biopolymer porous structures, capable of liquid transportation via capillary action, in other words, without the use of external forces. To that extent various production techniques were explored. The most promising results come from a salt-leaching technique combined with oxygen plasma exposure, wich allowed the transformation of non-wetting, hydrophobic polymer in microfluidic porous matrices.

The membranes developed were then used as a platform to achieve the production of a glucose colorimetric biosensor for aqueous solutions based on enzymatic reactions.

LISTA DE ACRÓNIMOS

CAD – *Computer-Aided Design*

DRX – Difração de raios-X

DSC – Differential Scanning Calorimetry

HA - Hidroxibutirato

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LB – Luria Bertani

mcl-PHA – *medium chain length Polyhydroxyalcanoate*

OAU – Óleo Alimentar Usado

P(3HB) – Poli(3-hidroxibutirato)

P(3HB-co-HV) – Poli(3-hidroxibutirato-co-valerato)

PEN – Polietileno Naftalado

PHA - Polihidroxialcanoato

PP - Polipropileno

scl-PHA – *short chain length Polyhydroxyalcanoate*

SEM – *Scanning Electron Microscopy*

TA – *Thermal Analysis*

TG – *Thermogravimetry*

UV – Ultra Violeta

LISTA DE SÍMBOLOS

μm – Micrómetro

A_λ – Absorvância

cm^3 – Centímetro Cúbico

d – Distância entre planos cristalográficos

dL – Decilitro

g – Gramas

GPa – Gigapascal

H – Hidrogénio

h – Horas

HCl – Ácido Clorídrico

Hg – Mercúrio

kDa – Kilodalton

L – Litro

M – Molar (mole por litro)

m/m – Massa por massa

mg – Miligrama

min – Minuto

mL – Mililitro

MPa – Megapascal

$m_{\text{polímero}}$ – Massa de biopolímero

m_{sal} – Massa de NaCl

Mt – Milhões de Toneladas

mW – Miliwatt

N – Azoto

n – Número de reflexão

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

nm – Nanómetro

O_2 – Oxigénio

O_3 – Ozono

$^\circ\text{C}$ – Graus Celsius

rpm – Rotações por minuto

S – Enxofre

T_m – *Melting Temperature*

U – Unidades

v/v – Volume por volume

$V_{\text{clorofórmio}}$ – Volume de clorofórmio

θ – Ângulo de Bragg

θ_i – Ângulo Incidente

θ_r – Ângulo Refletido

λ – Comprimento de onda

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	VII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT	XI
LISTA DE ACRÓNIMOS	XIII
LISTA DE SÍMBOLOS	XV
ÍNDICE.....	XVII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIX
ÍNDICE DE TABELAS	XXV
ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS	XXVII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Polímeros Microbianos	1
1.1.1 PHAs	2
1.1.2 Poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)]	3
1.1.3 Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (P(3HB-co-3HV))	4
1.2 Microfluídica.....	5
1.3 Biossensores	6
1.3.1 Biossensores para deteção de Glucose	6
1.4 Biopolímeros Biodegradáveis como Plataforma para Testes de Diagnóstico Colorimétricos	8
2 TÉCNICAS DE CARATERIZAÇÃO	9
2.1 Análise Térmica.....	9
2.1.1 Análise Termogravimétrica.....	9
2.1.2 Calorimetria Diferencial de Varrimento	9
2.2 Difração de Raios-X	10
2.3 Microscopia Eletrónica de Varrimento	12
2.4 Porosimetria por Injeção de Mercúrio	13
2.5 Teste de Capilaridade	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS.....	17
3.1 Preparação do Teste de Diagnóstico Colorimétrico	17
3.1.1 Produção de P(3-HB) e P(3HB-co-HV).....	17

3.1.2	Produção de Membranas Adsorventes	19
3.1.2.1	Lixiviação Com Sal	19
3.1.2.2	Emulsão de Água em Clorofórmio.....	22
3.1.2.3	Tratamento com Radiação UV e Ozono (UV – O ₃).....	23
3.1.2.4	Tratamento com Plasma de Oxigênio	25
3.1.3	Sistema de Detecção Colorimétrica de Glucose	25
4	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS	29
4.1	Produção de P(3HB) e (P(3HB-co-HV)	29
4.2	Caracterização do P(3HB) e do P(3HB-co-HV)	30
4.2.1	Análise Termogravimétrica e Calorimetria Diferencial de Varrimento	30
4.2.2	Difração de Raios-X	33
4.2.3	Microscopia Eletrônica de Varrimento	34
4.3	Produção de Membranas Porosas.....	35
4.3.1	Lixiviação com sal	35
4.3.1.1	Microscopia Eletrônica de varrimento	45
4.3.2	Emulsão de Água em Clorofórmio	46
4.3.2.1	Microscopia eletrônica de varrimento	48
4.3.3	Tratamento com UV/O ₃	49
4.3.3.1	Microscopia Eletrônica de Varrimento	50
4.3.4	Tratamento com Plasma de O ₂	51
4.3.4.1	Microscopia Eletrônica de Varrimento	54
4.4	Caracterização das membranas porosas	56
4.4.1	Porosimetria	56
4.4.2	Determinação de Volume Adsorvido.....	58
4.5	Teste de Diagnóstico Colorimétrico	58
5	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	61
6	BIBLIOGRAFIA	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Estrutura do monómero 3-hidroxibutirato (3-HB). Adaptado de [20];	4
Figura 1.2 - Estrutura do monómero hidroxibutirato-co-valerato (3HB-co-HV). Adaptado de[23];	5
Figura 1.3 – Exemplos de reações enzimáticas utilizadas na medição colorimétrica da concentração de glucose de uma solução biológica. Adaptado de [33]	7
Figura 2.1 - Equipamento <i>STA 449 F3 Jupiter</i> da <i>NETZSCH</i> ;	10
Figura 2.2 - Esquema do efeito da difração de raios-X num material com estrutura cristalina [43];	11
Figura 2.3 – Esquema da composição do Microscópio Eletrónico de Varrimento;	13
Figura 2.4 - Porosímetro de mercúrio <i>AutoPore IV 9500</i> da <i>Micromeritics</i> (EUA) usado para determinar o diâmetro médio dos poros das membranas poliméricas;.....	14
Figura 2.5 - Teste de capilaridade efetuado nos canais porosos. O corante é colocado num extremo do canal (A) e, caso o resultado seja negativo para fenómenos de capilaridade, o corante não avança (B1). Caso seja positivo, o corante molha o canal por completo (B2);.....	15
Figura 3.1 – (A) Biorreator de vidro e controlador de bancada <i>Biostat B plus</i> , comercializado pela Sartorius; (B) Espectrofotómetro UV/Visível V-1200, comercializado pela VWR;	18
Figura 3.2 – (A) Centrífuga <i>Sigma 4-16KS</i> ; (B) P(3HB) em pó, comercializado pela empresa Biomer;.....	19
Figura 3.3 - Esquema passo a passo da produção de membranas porosas através da Lixiviação com Sal, onde os cristais de NaCl são misturados na dissolução de polímero em clorofórmio, e a mistura vertida numa placa de Petri. Após evaporação do clorofórmio, os cristais são lavados com água destilada;.....	20
Figura 3.4 - Esquema passo a passo da produção de membranas porosas através da Lixiviação com Sal onde a dissolução de polímero em clorofórmio é vertida diretamente sobre os cristais de NaCl. Após evaporação do clorofórmio, os cristais são lavados com água destilada;.....	21
Figura 3.5 - Esquema passo a passo da produção de membranas porosas através da Lixiviação com Sal onde os cristais de NaCl são misturados com o pó de polímero, e a mistura é aquecida num forno ou prensa. Após arrefecida, a membrana é lavada com água destilada de forma a remover os cristais de NaCl;	21

Figura 3.6 – (A) cadinhos em cerâmica resistentes a altas temperaturas utilizados em mufla; (B) mufla elétrica L 3/12 da <i>Nabertherm</i> (Alemanha); (C) prensa térmica <i>Heatpressuk</i> (Reino Unido);	22
Figura 3.7 - Esquema passo a passo da produção de membranas porosas através da uma emulsão de água em polímero dissolvido em clorofórmio;.....	22
Figura 3.8 – Equipamento de tratamento com radiação UV e O ₃ <i>novascan PSD Pro Series</i> (<i>Novascan Technologies, Inc.</i> EUA);.....	23
Figura 3.9 - Esquema da produção de canais hidrofílicos através do tratamento com UV/O ₃ e plasma de O ₂ , recorrendo a uma máscara de fita adesiva de kapton;.....	24
Figura 3.10 - Esquema da produção de canais hidrofílicos através do tratamento com UV/O ₃ ou plasma de O ₂ , com o auxílio do laser;.....	24
Figura 3.11 - Equipamento <i>Zepto Low Cost Plasma Laboratory Unit</i> , comercializado pela <i>Diener Electronics</i> (Alemanha);	25
Figura 3.12 - Disposição da zona de deposição, canal de condução e zona de reação no biossensor de glucose;.....	26
Figura 3.13 - Esquema passo a passo da produção de dispositivos de deteção de Glucose;.....	26
Figura 4.1 – (A) P(3HB) produzido a partir de OAU, sob a forma de membrana fina; (B) P(3HB-co-HV) produzido a partir de polpa de maçã residual, na sua forma fibrosa;.....	30
Figura 4.2 - Análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varrimento para o P(3HB) produzido a partir de UCO;.....	31
Figura 4.3 - Análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varrimento para o P(3HB) comercial da Biomer;	31
Figura 4.4 - Análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varrimento para o P(3HB-co-HV) produzido a partir de polpa de maçã residual;	32
Figura 4.5 - Difratoograma dos polímeros: (A) P(3HB) produzido a partir de OAU; (B) P(3HB) Biomer; e (C) P(3HB-co-HV) produzido a partir de polpa de maçã residual;.....	33
Figura 4.6 – (A) imagem de SEM de uma membrana de P(3HB) produzido a partir de OAU, criada por evaporação de solvente; (B) imagem de SEM de uma membrana de P(3HB) Biomer, criada por evaporação de solvente; (C) imagem de SEM de uma membrana de P(3HB-co-HV), criada por evaporação de solvente;	35

Figura 4.7 – (A) Membrana produzida por lixiviação com sal através da fusão em forno de P(3HB) misturado com NaCl ($m_{polímero}=0,51$ g, $m_{sal}=0,76$ g); (B) Membrana produzida por lixiviação com sal através da fusão em forno de P(3HB) misturado com NaCl, com aplicação de pressão na mistura à saída do forno ($m_{polímero}=0,50$ g, $m_{sal}=0,77$ g); (C) Membrana produzida por lixiviação com sal através da fusão em forno de P(3HB) sobre NaCl, com aplicação de pressão na mistura à saída do forno ($m_{polímero}=0,51$ g, $m_{sal}=0,76$ g);..... 36

Figura 4.8 – (A) Membrana produzida por lixiviação com sal através da fusão em forno de P(3HB) misturado com NaCl ($m_{polímero}=0,05$ g, $m_{sal}=0,05$ g); (B) Membrana produzida por lixiviação com sal através da fusão em forno de P(3HB) sobre cristais de NaCl ($m_{polímero}=0,05$ g, $m_{sal}=0,05$ g); (C) Membrana produzida por lixiviação com sal através da fusão em forno de P(3HB) misturado com NaCl ($m_{polímero}=0,04$ g, $m_{sal}=0,09$ g); 38

Figura 4.9 - (A) Membrana produzida por lixiviação com sal através da fusão de P(3HB) em prensa sobre NaCl ($m_{polímero}=0,05$ g, $m_{sal}=0,05$ g); (B) Membrana produzida por lixiviação com sal através da fusão de P(3HB) em prensa utilizando uma máscara de PEN e NaCl ($m_{polímero}=0,04$ g, $m_{sal}=0,05$ g); (C) Membrana produzida por lixiviação com sal através da fusão de P(3HB) em prensa utilizando uma máscara de acetato e NaCl ($m_{polímero}=0,04$ g, $m_{sal}=0,05$ g);..... 40

Figura 4.10 - (A) Membrana produzida por lixiviação com sal através da fusão de P(3HB) em prensa sobre NaCl ($m_{polímero}=0,06$ g, $m_{sal}=0,06$ g); (B) Membrana produzida por lixiviação com sal através da fusão de P(3HB) em prensa sobre NaCl ($m_{polímero}=0,05$ g, $m_{sal}=0,05$ g); (C) Membrana produzida por fusão de P(3HB) no forno ($m_{polímero}=0,23$ g);..... 41

Figura 4.11 - Membranas produzidas através da mistura de sal na solução de polímero em clorofórmio (em baixo) e respectivos testes de capilaridade, no instante $t=20$ min (em cima): (A) membrana de P(3HB) obtido a partir de OAU ($m_{polímero}=0,50$ g, $m_{sal}=0,51$ g, $V_{clorofórmio}=10$ mL); (B) Membrana de P(3HB-co-HV) obtido a partir de polpa de maçã residual ($m_{polímero}=0,21$ g, $m_{sal}=0,21$ g, $V_{clorofórmio}=10$ mL); (C) membrana de P(3HB) Biomer ($m_{polímero}=0,30$ g, $m_{sal}=0,31$ g, $V_{clorofórmio}=10$ mL);..... 42

Figura 4.12 - Membranas produzidas com P(3HB) obtido a partir de OAU por lixiviação com sal através da evaporação do solvente (em baixo) e respectivos testes de capilaridade, no instante $t=20$ min (em cima): (A) $m_{polímero}=0,50$ g, $m_{sal}=0,76$ g, $V_{clorofórmio}=10$ mL; (B) $m_{polímero}=0,29$ g, $m_{sal}=0,92$ g, $V_{clorofórmio}=10$ mL; (C) $m_{polímero}=0,15$ g, $m_{sal}=1,51$ g, $V_{clorofórmio}=10$ mL);..... 43

Figura 4.13 - Dimensionamento dos moldes tridimensionais criados através do software de desenho assistido por computador Fusion360, Autodesk (EUA); 44

Figura 4.14 - Moldes tridimensionais produzidos a partir de resina para altas temperaturas, com a impressora 3D Form 2, comercializadas pela formlabs (EUA) (em baixo); Resultado da produção de membranas por evaporação de solvente em moldes tridimensionais (em cima).....	45
Figura 4.15 - Imagem de SEM das membranas produzidas por lixiviação com sal (polímero/NaCl=50/50) (m/m) através da evaporação do solvente: (A) P(3HB) obtido a partir de OAU; (B) P(3HB) Biomer; (C) P(3HB-co-HV) obtido a partir de polpa de maçã residual;	46
Figura 4.16 - Membranas fabricadas através da evaporação do solvente de uma emulsão de água (fase dispersa) em solução de polímero em clorofórmio (fase contínua): (A) P(3HB) obtido a partir de OAU ($m_{\text{polímero}}=0.29$ g, $V_{\text{clorofórmio}}=10$ mL, $V_{\text{água}}=1$ mL); (B) P(3HB) Biomer ($m_{\text{polímero}}=0.30$ g, $V_{\text{clorofórmio}}=10$ mL, $V_{\text{água}}=1$ mL); (C) P(3HB-co-HV) obtido a partir de polpa de maçã residual ($m_{\text{polímero}}=0.23$ g, $V_{\text{clorofórmio}}=10$ mL, $V_{\text{água}}=1$ mL);	47
Figura 4.17 - (A) Exsicador de vidro com gel de sílica utilizado na produção de membranas poliméricas; (B1) membrana produzida através de uma emulsão de água em clorofórmio e evaporação de solvente em exsicador; (B2) teste de capilaridade numa tira da membrana B1; .	48
Figura 4.18 - Imagens de SEM da superfície das membranas produzidas por evaporação de solvente de emulsões de água em solução de P(3HB) obtido a partir de OUA em clorofórmio: (A) evaporação rápida em <i>hotte</i> (48h); (B) evaporação lenta em exsicador de vidro (72h);	49
Figura 4.19 - Fotografias do teste de capilaridade com corante alimentar a membranas expostas a 120 min de tratamento UV/O3 no instante inicial (em baixo) e passados 20 min (em cima): (A) membrana de P(3HB) obtido a partir de OAU; (B) membrana P(3HB) Biomer; (C) membrana de P(3HB-co-HV) obtido a partir de polpa de maçã residual;	50
Figura 4.20 - Imagem de SEM das membranas obtidas por evaporação do solvente submetidas a 120 min de tratamento UV/O3: (A) P(3HB) obtido a partir de OAU; (B) P(3HB) Biomer; (C) P(3HB-co-HV) obtido a partir de polpa de maçã residual;	51
Figura 4.21 – Fotografias do teste de capilaridade com corante alimentar a membranas de P(3HB) obtido a partir de OAU e expostas a tratamento com plasma de O ₂ , no instante inicial (em baixo) e passados 10 min (em cima): (A) 7 min de exposição ao plasma; (B) 10 min de exposição ao plasma; (C) 13 min de exposição ao plasma;	52
Figura 4.22 - Tratamento com plasma de O ₂ em canais portados a laser a partir de uma membrana de P(3HB) Biomer produzida através de lixiviação com sal e evaporação de solvente a: (A) 13 minutos de exposição; (B) 7 minutos de exposição; (C) 5 minutos de exposição e (D) 3 minutos de exposição;	54

Figura 4.23 - Imagem de SEM das membranas obtidas por evaporação de solvente submetidas a 10 min de tratamento de plasma de O ₂ : (A) P(3HB) obtido a partir de OAU; (B) P(3HB) Biomer; (C) P(3HB-co-HV) obtido a partir de polpa de maçã residual;.....	55
Figura 4.24 - Imagem de SEM das membranas obtidas por lixiviação com sal (polímero/NaCl=50/50) (m/m) e evaporação de solvente, submetidas a 10 min de tratamento de plasma de O ₂ : (A) P(3HB) obtido a partir de OAU; (B) P(3HB) Biomer; (C) P(3HB-co-HV) obtido a partir de polpa de maçã residual;.....	55
Figura 4.25 - Intrusão Cumulativa e Diferencial do mercúrio em função do diâmetro dos poros das membranas de P(3HB) Biomer. (A) membrana obtida por evaporação de solvente; (B) membrana obtida por evaporação de solvente e lixiviação com sal; (A) membrana obtida por evaporação de solvente e lixiviação com sal em conjunto com 13 min de tratamento de plasma de O ₂ ;	57
Figura 4.26 - Resultados digitalizados do teste de capacidade volumétrica dos canais de detecção;	58
Figura 4.27 - Resultados digitalizados do sensor colorimétrico de glucose;	59
Figura 4.28 - Análise RGB da resposta do indicador AB para as diversas concentrações de glucose	60

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 - Soluções padrão utilizadas na calibração dos dispositivos de detecção de glucose; 27

Tabela 4.1 – Porosidade e diâmetro médio dos poros de 3 membranas de P(3HB) Biomer;..... 57

ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS

Os plásticos de origem petroquímica, utilizados em grande escala desde a Segunda Guerra Mundial, são uma importante comodidade no nosso quotidiano, contribuindo significativamente para o aumento da qualidade de vida dos humanos. Contudo, estes materiais são compostos por macromoléculas de monómeros ligados entre si por ligações carbono-carbono fortes, implicando que quando depositados numa lixeira ou num ambiente natural, não são decompostos por microrganismos e acumulam ao invés de degradar.

Esta acumulação de plástico tornou-se um dos grandes problemas ambientais e de gestão de resíduos da atualidade. Calcula-se que, até ao ano de 2015, foram produzidas globalmente cerca de 6300 milhões de toneladas (Mt) de plástico residual. Destes apenas 9% se destinou a reciclagem e outros 12% a incineração, enquanto que a maior parte, 79%, foram depositados em lixeiras ou em ambiente natural [1]. A esta problemática acresce o facto de o plástico ser produzido a partir de um recurso finito, como é o caso do petróleo, o que vem agravar a já existente preocupação em relação à escassez desta matéria prima.

Assim, parar de agravar os efeitos negativos da acumulação de plástico no meio ambiente significa redirecionar o interesse científico e industrial para longe dos polímeros derivados de petróleo e em direção aos biopolímeros. Estes, devido à sua biodegradabilidade e processos de produção que respeitam o meio ambiente, apresentam-se como uma alternativa sustentável [2].

Atualmente existem vários tipos de bioplásticos em desenvolvimento, que recebem muita atenção da comunidade científica. Em particular os polihidroxialcanoatos (PHAs), pois são poliésteres com propriedades térmicas e mecânicas muito semelhantes às dos termoplásticos à base de petróleo, com as grandes vantagens de serem produzidos por microrganismos a partir de fontes de carbono renováveis e de serem 100% biodegradáveis.

Nas últimas décadas assistiu-se a uma explosão no ramo da microfluídica no sentido de automatizar, miniaturizar e reduzir o custo de exames de diagnóstico de doenças, com o objetivo de criar dispositivos de diagnóstico rápido e acessíveis para zonas com poucos recursos clínicos. Tradicionalmente, estes dispositivos são descartáveis e requerem baixa quantidade de amostra e de reagentes, devolvendo rapidamente um resultado. Contudo, são principalmente compostos por plásticos, dimetil polissiloxano ou silicone, que podem ser substituídos por papel, como a investigação em microfluídica e em testes de diagnóstico rápido tem demonstrado [3]–[5].

Utilizar papel como substrato para biossensores é, então, uma alternativa económica, simples e significativamente mais amiga do ambiente, quando comparada com o suporte tradicional. Ainda assim, todos os anos, não só biliões de metros cúbicos de água são consumidos pela

indústria do papel, mas também são produzidas enormes quantidades de água residual altamente poluída [6].

Considerando todos estes fatores, constata-se a importância de estudar a viabilidade dos bioplásticos como possíveis plataformas para dispositivos de diagnóstico rápido, de modo a:

- a) Estudar diretamente novas funcionalidades dos biopolímeros, em comparação com plásticos petroquímicos e papel, para melhor compreender as suas propriedades físicas, químicas e mecânicas, bem como testar métodos de produção mais eficientes e rentáveis;
- b) Produzir tecnologias de raiz utilizando plásticos biodegradáveis que, enquanto oferecem um estudo indireto sobre o desempenho e características dos biopolímeros, promovem a redução da dependência em plásticos convencionais e papel.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Neste estudo é sugerido o uso de poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)) e de um copolímero, poli(3-hidroxibutirato-*co*-hidroxivalerato) (P(3HB-*co*-HV)), como plataforma para um dispositivo de diagnóstico rápido para detecção de glucose.

Com base na tecnologia *lab-on-paper* [3], é proposto o mapeamento de canais hidrofílicos no substrato feito de P(3HB) ou P(3HB-*co*-HV), que são inerentemente hidrófobos, tendo como objetivo a funcionalização destes biopolímeros no sentido de criar um biossensor de fluxo lateral que permita a avaliação colorimétrica da concentração de glucose numa amostra.

Estes canais são obtidos através de várias técnicas que permitem o aumento da porosidade e da molhabilidade de membranas poliméricas como lixiviação com sal, criação de emulsões de água em clorofórmio, tratamento com radiação UV e ozono, e o tratamento com plasma de oxigénio.

Os polímeros utilizados e as membranas produzidas a partir destes foram testados e caracterizados por Análise Termogravimétrica (TG, do inglês *Thermogravimetry*), Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*), Difração de Raios X (DRX), Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM, do inglês *Scanning Electron Microscopy*) e por Porosimetria por Injeção de Mercúrio.

1.1 Polímeros Microbianos

De acordo com o Sistema de nomenclatura IUPAC (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*), um polímero é uma categoria de substâncias químicas compostas por macromoléculas [7]. Estas são moléculas com massa molecular relativa alta (kDa), cuja estrutura em cadeia abarca múltiplas repetições de moléculas de massa molecular relativa baixa, denominadas de monómeros [8].

Os biopolímeros são polímeros lineares produzidos sob condições naturais a partir de organismos vivos. Servem um amplo leque de funções às células produtoras, como por exemplo

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

reserva de carbono e energia, catálise de reações, proteção contra outros organismos ou contra condições ambientais adversas, entre outros [9].

Podem ser sintetizados por um vasto leque de microrganismos e plantas, a partir de recursos renováveis e através de processos que respeitam o meio ambiente. Mais ainda, a grande parte destes biopolímeros, para além de completamente biodegradável [9][10], é também biocompatível.

Devido ao extensivo estudo dedicado a estes materiais nos últimos anos, um vasto leque de propriedades e aplicações está atualmente documentado, visando substituir materiais menos favoráveis, tais como plásticos de origem petroquímica.

1.1.1 PHAs

Dentro dos polímeros de origem bacteriana, destacam-se os polihidroxialcanoatos (PHAs). Os PHAs são poliésteres termoplásticos biodegradáveis de hidroxialcanoatos (HA), produzidos a partir de fontes de carbono através de diversos microrganismos que as utilizam como armazenamento de energia, sob a forma de grânulos intracelulares. Estas reservas granulares, em certas espécies, conseguem ocupar até 90% do peso seco da célula [10][11].

Propriedades dos PHAs

As propriedades dos PHAs variam consoante a sua estrutura, composição, e distribuição de peso molecular. Estes poliésteres são estáveis em contacto com ar, inertes, insolúveis em água e possuem características termoplásticas [12][13]. Degradam-se por completo formando dióxido de carbono e água em condições aeróbias, e formando metano e dióxido de carbono em condições anaeróbias, por microrganismos de diferentes meios naturais [14].

Cerca de 150 estruturas diferentes de PHAs foram identificadas até ao presente [12][15], divididas em duas categorias consoante o número de átomos de carbono presentes em cada estrutura monomérica: de 3 a 5 são PHAs de cadeia curta (do inglês *short chain length*, scl-PHAs) enquanto que de 6 a 14 são considerados PHAs de cadeia média (do inglês *medium chain length*, mcl-PHA). Os scl-PHAs são geralmente utilizados na produção de itens descartáveis como empacotamentos e sacos plásticos. Por outro lado, os mcl-PHAs comportam-se como elastómeros, tornando-se vantajosos para aplicações biomédicas e cirúrgicas, como por exemplo implantes, matrizes biodegradáveis para cultura de células, próteses, entre outros.

Produção de PHAs

Os PHAs são uma família de polímeros produzidos naturalmente em vários microrganismos, onde cerca de 300 espécies diferentes, das quais grande parte são bactérias, foram documentadas até à data como capazes de acumular estes biopolímeros [16].

Estas bactérias dividem-se em dois grupos, dependendo das condições de stress necessárias para a produção de PHA: (1) bactérias que requerem a limitação de um nutriente essencial enquanto na presença de disponibilidade em carbono e (2) bactérias que não requerem limitações nutritivas para produzirem PHA [2].

A possibilidade de utilização de subprodutos provenientes da atividade do sector agrícola e industrial, ricos em carbono como matéria-prima na produção de PHAs, torna ainda mais atraente o investimento nestes bioplásticos biodegradáveis, pois permite reduzir ainda mais a sua pegada ecológica.

Contudo, a produção e comercialização em massa de PHAs continua a não acontecer devido, em grande parte, aos elevados custos de produção que resultam num preço 3 a 4 vezes mais elevado quando comparado com plásticos como o polipropileno (PP). Estes custos devem-se aos preços elevados associados aos substratos puros, como a glucose, e à quantidade de solventes e mão-de-obra qualificada necessários para encaminhar o processo até ao produto final [15].

Devido aos avanços na biotecnologia, a utilização de culturas microbianas puras encontra-se atualmente implementada a nível industrial, existindo uma grande variedade de produtos disponíveis criados a partir de compostos metabólicos de estirpes específicas de bactérias. Porém os plásticos produzidos a partir de culturas puras não se apresentam como uma alternativa viável ao plástico petroquímico, por consequência dos custos associados a esta técnica. De modo a transformar os PHAs em alternativas economicamente viáveis, verifica-se então um grande esforço no sentido de estudar o uso de culturas microbianas mistas em sistemas abertos, reduzindo assim os gastos com a manutenção de condições assépticas [15][17].

Como é explorado neste trabalho, um dos resíduos utilizados para alimentar a produção de PHAs é o óleo alimentar usado (OAU). Este trata-se de um subproduto da Indústria Alimentar, composto maioritariamente por triglicéridos, com uma produção anual estimada nas 3,55 Mt [18]. Embora uma parte deste OAU seja aproveitado para produção de biodiesel, existe um excedente que pode vir a ser eficientemente convertido em outros produtos com valor acrescido, como é o caso dos PHAs [18].

1.1.2 Poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)]

Primeiramente documentado em 1926 pelo francês Maurice Lemoigne [19], o poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)] foi o primeiro PHA a ser identificado e é, em conjunto com o seu copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (P(3HB-co-3HV)), o polímero biodegradável mais estudado e utilizado atualmente. Trata-se de um scl-PHA composto pela repetição do monómero 3-hidroxibutirato (3-HB), visível na figura 1.1, que possui características físicas e mecânicas semelhantes às de resinas sintéticas, como o PP.

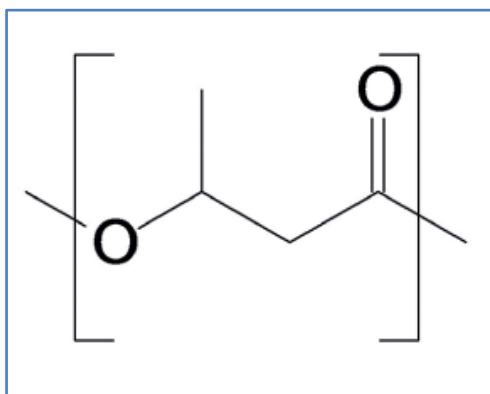


Figura 1.1 - Estrutura do monômero 3-hidroxibutirato (3-HB). Adaptado de [20];

Propriedades do P(3HB)

O homopolímero P(3HB) é insolúvel em água, resistente a degradação hidrolítica, e tem baixa permeabilidade a O₂ [2]. Quando comparado com o PP, um polímero de origem petroquímica, possui boas características termoplásticas (temperatura de fusão igual a 179 °C; temperatura de transição vítrea de 4 °C) porém fracas propriedades mecânicas como o módulo de Young, igual a 3,5 GPa e o alongamento na ruptura, de apenas 5% [2][14].

A densidade do PHB cristalino e amorfo, produzido por amplificação e clonagem do gene de biossíntese de PHA do *Cupriavidus necator*, em *Escherichia coli* recombinante, é de 1,26 e 1,18 g/cm³, respectivamente. O P(3HB) produzido a partir de estirpes de microrganismos de ocorrência natural, ou seja, selvagens, possui pesos moleculares no intervalo de [10 kDa – 30 kDa] com uma polidispersão aproximadamente igual a 2, dependente do tipo de microrganismo, mecanismo de fermentação, e matéria-prima utilizados [2].

Devido à sua estrutura quiral com configuração R, o monômero (3-HB) é uma molécula muito cristalina, e as estruturas cristalinas que forma apresentam comportamentos piezoelétricos. A aplicação de uma força na estrutura lamelar uniaxial do P(3-HB) resulta na alteração da direção do momento dipolar do material, uma propriedade comum a vários biopolímeros (madeira, osso, polissacarídeos) mas pouco comum nos plásticos, tornando os PHAS numa classe de polímeros muito especial [2][12].

1.1.3 Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (P(3HB-co-3HV))

Desde a sua descoberta, nos anos 20, acreditava-se que os PHAs eram criados a partir de um único monômero, o 3HB. Infelizmente, plástico formado apenas pelo homopolímero P(3HB) torna-se inevitavelmente mais rígido e frágil [21].

Contudo, já em 1973, a identificação de estruturas de HAS diferentes da (3-HB) na composição dos PHAs trouxe novas propriedades e potenciais aplicações para estes plásticos

biodegradáveis [22]. Esta descoberta possibilitava assim a criação de misturas de diferentes copolímeros visando o melhoramento de determinadas características físicas e mecânicas, como por exemplo a cristalinidade, o ponto de fusão e a rigidez [12].

Para o poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) (P(3HB-*co*-HV)), cujo monómero se encontra representado na figura 1.2, quanto maior a fração de 3HV, mais flexível se torna o copolímero (menor módulo de Young). Verifica-se também um maior alongamento na rutura e uma descida da temperatura de fusão, sem afetar a temperatura para a qual ocorre degradação térmica [14].

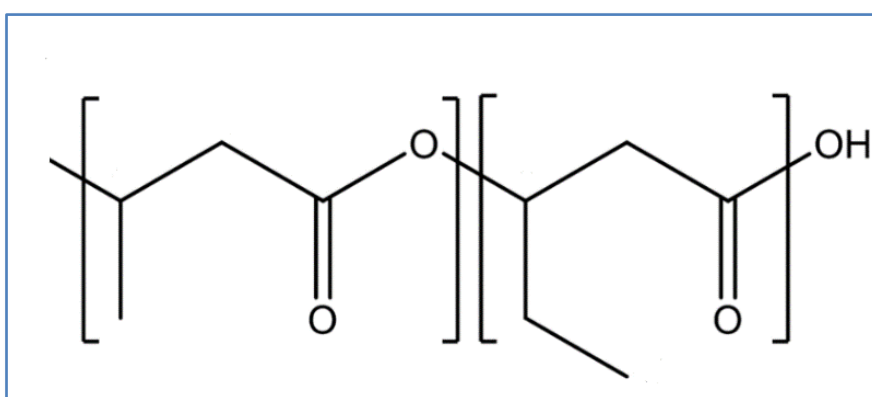


Figura 1.2 - Estrutura do monómero hidroxibutirato-*co*-valerato (3HB-*co*-HV). Adaptado de [23];

Propriedades do P(3HB-*co*-HV)

As propriedades deste bioplástico dependem da fração molar de (3-HV) que, entre os 3 e 25 mol% 3HV, confere ao copolímero, respetivamente, temperaturas de fusão entre os 170 °C e os 137 °C, módulos de Young entre os 2,9 e os 0,7 GPa e resistência à tração entre os 38 e os 30 MPa [2] [14][21].

1.2 Microfluídica

A Microfluídica é um ramo jovem e em expansão da área científica e tecnológica que está relacionada com a manipulação de volumes reduzidos de fluidos, com dimensões na ordem dos microlitros, em canais com diâmetro entre dezenas e centenas de micrómetros. Esta tecnologia mostra-se promissora em áreas como a química, biologia, medicina, sensores e materiais [24].

O crescente interesse nesta área deve-se às diversas vantagens possuídas pelos dispositivos que utilizam conceitos de microfluídica, sobre as tecnologias convencionais, tais como a necessidade de quantidades reduzidas de reagentes, utilização simples, resultados rápidos e adaptabilidade para produção em massa [25].

Um fluido, seja gás, líquido ou plasma, caracteriza-se como uma substância que, quando em repouso, não consegue sustentar tensões aplicadas, independentemente da magnitude dessas

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

tensões, deformando sem resistência. Por outras palavras um fluido adquire a forma do recipiente que o contém, e quando uma força externa deformadora cessa a sua ação, não retorna necessariamente para a sua forma original [26]. Todavia, resiste à velocidade de deformação. Esta resistência, que se opõe ao deslizamento entre camadas adjacentes do fluido, está relacionada com a sua viscosidade [26].

Quando se passa de um sistema macroscópico para um sistema microscópico, o comportamento dos fluidos perde alguma da sua intuição. Os fatores de escala – variáveis adimensionais que expressam relações de quantidades físicas com o tamanho do sistema em estudo – revelam importantes alterações quanto às diferentes significâncias de uma força em relação a outra, por exemplo entre as forças de volume (gravidade e inércia), e as forças de superfície (tensão superficial e viscosidade):

$$\frac{\text{forças de superfície}}{\text{forças de volume}} = \frac{l^2}{l^3} = l^{-1} \xrightarrow{l \rightarrow 0} \infty \quad \text{Equação 1.1}$$

Isto implica que, à escala dos micrómetros, as forças de superfície sejam mais significantes que as forças de volume. Na prática, significa poder-se, por exemplo, movimentar fluidos por capilaridade contra o efeito da gravidade [26].

Uma das primeiras aplicações de microfluídica foi em análises químicas que, através das vantagens já referidas, tornava possível a utilização de amostras muito reduzidas para a realização de separações e deteções de alta resolução e sensibilidade [27].

Tradicionalmente, os dispositivos microfluídicos eram produzidos à base de silício ou vidro. Porém, no final do século XX, verificou-se um grande investimento no desenvolvimento de dispositivos feitos à base de polímeros [25]. Esta evolução atribui-se a processos de fabricação mais rápidos e económicos, bem como à necessidade de dispositivos de diagnóstico descartáveis.

Hoje em dia estes dispositivos são produzidos a partir de um vasto leque de materiais, incluindo plásticos, elastómeros, cerâmicos, metais, silicone, vidro, papel, géis e cera [28].

1.3 Biossensores

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo analítico e compacto, que incorpora um elemento de reconhecimento sensível a certos componentes biológicos, integrado com um transdutor físico-químico [29].

A tecnologia dos biossensores desenvolveu-se rapidamente nos últimos anos e desempenha um papel muito importante, principalmente na medicina, como poderoso instrumento de análise. Em 2004, 85% do mercado dos biossensores era dominado pelos biossensores de glucose [30].

1.3.1 Biossensores para deteção de Glucose

A diabetes, uma das principais causas de morte no mundo, é uma doença que se manifesta quando um organismo apresenta uma deficiente produção ou utilização de insulina. A insulina trata-se de uma hormona responsável pela regulação da glicémia e, quando a sua produção ou

utilização deixam de funcionar corretamente, os níveis de glucose no sangue podem subir para valores perigosos que colocam em risco a vida do indivíduo (valores saudáveis, em jejum, entre os 70 e os 130 mg/dL [31]).

Sem dúvida que a monitorização dos níveis de glicémia constitui uma ferramenta de prevenção e diagnóstico muito valiosa no controle da epidemia que é a diabetes. Por este motivo, nos últimos 50 anos tem-se observado um grande investimento no desenvolvimento de tecnologias de deteção de glucose, nomeadamente em sistemas de monitorização contínua de glucose, em sistemas de monitorização não invasivos e em dispositivos de diagnóstico rápido [30].

A deteção colorimétrica de glucose é a técnica mais utilizada em dispositivos analíticos à base de papel, onde a glucose oxidase, em conjunto com a peroxidase, reagem de forma a promover uma alteração de cor na solução nos indicadores escolhidos. A oxidação da glucose é catalisada pela glucose oxidase resultando em peróxido de hidrogénio. Posteriormente a peroxidase utiliza o peróxido de hidrogénio para oxidar os indicadores, numa reação proporcional à concentração de glucose na amostra [4][32]. Na figura 1.3 encontram-se esquematizados alguns exemplos de reações enzimáticas para deteção colorimétrica de glucose.

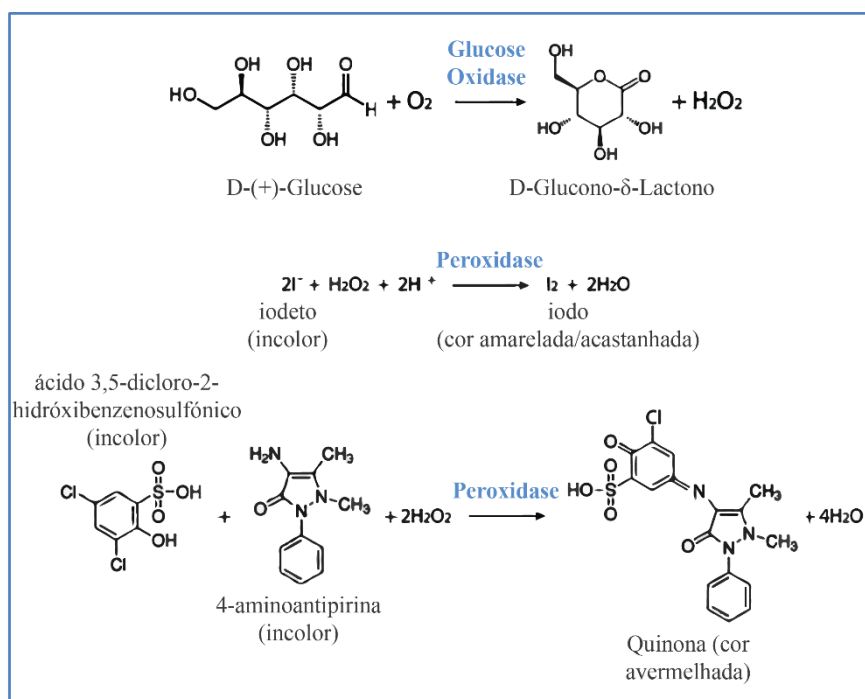


Figura 1.3 – Exemplos de reações enzimáticas utilizadas na medição colorimétrica da concentração de glucose de uma solução biológica. Adaptado de [33]

1.4 Biopolímeros Biodegradáveis como Plataforma para Testes de Diagnóstico Colorimétricos

O papel é um material hidrofílico por natureza, o que significa que, para o mapeamento de canais com o objetivo de manipular fluídos neste substrato, é necessário definir barreiras hidrofóbicas que retenham o fluído num volume confinado.

Já no caso do polímero P(3HB) e do copolímero P(3HB-*co*-HV), a situação inverte-se. O substrato é inerentemente hidrofóbico e é necessária a criação de canais hidrofílicos para o movimento de fluídos em direção a regiões de interesse.

Quanto à microfluídica aplicada especificamente a PHAs, até à data nenhum estudo foi realizado sobre o assunto. Porém, vários estudos abordam com sucesso a produção de matrizes porosas a partir de PHAs para diversas finalidades, destacando-se suporte para proliferação de células ósseas e musculares, matriz para o desenvolvimento de estruturas cartilaginosas e veículo biodegradável de fármacos, utilizando a técnica de lixiviação com sal [34]–[37]. É também abordada a utilização de tratamentos de superfície no melhoramento da molhabilidade e biocompatibilidade dos polímeros [12][38].

Pretende-se então, utilizando várias técnicas de funcionalização dos PHAs, em conjunto com conceitos de microfluídica em papel, mais concretamente da tecnologia *lab-on-paper*, criar um dispositivo de fluxo-lateral para diagnóstico rápido que tem como base um polímero biodegradável.

TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

2.1 Análise Térmica

A Análise Térmica (TA, do inglês *Thermal Analysis*) de materiais compreende um conjunto de métodos analíticos utilizados para descrever o comportamento de amostras em função da temperatura. São métodos muito utilizados no estudo de polímeros, pois fornecem informação sobre as temperaturas para as quais acontecem transições de estado, ou até sobre a temperatura de degradação do material.

2.1.1 Análise Termogravimétrica

Um caso particular das técnicas de TA é a Análise Termogravimétrica (TG, do inglês *Thermogravimetry*), que estuda a variação de massa de uma amostra em função da temperatura (com intervalos e taxas de variação de temperatura programáveis) ou em função do tempo (temperatura mantida constante).

Certas transições térmicas, como a fusão, cristalização ou transição vítrea, acontecem sem alteração da massa da amostra em estudo, não sendo registradas nesta análise. Contudo, transformações como a absorção, dessorção, sublimação, vaporização, oxidação, redução ou decomposição resultam em variações de massa, o que significa que a TG pode ser utilizada para catalogar a temperatura à qual ocorrem estes fenómenos e estudar a estabilidade térmica e a degradação da amostra escolhida [39].

2.1.2 Calorimetria Diferencial de Varrimento

A Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) possibilita a determinação das temperaturas de fusão, de cristalização e de transições mesomorfas de um material, em paralelo com as entalpias e entropias respectivas a cada transição térmica. Possibilita ainda caracterizar transições vítreas e outros efeitos que alteram a capacidade calorífica das amostras [40].

CAPÍTULO 2: TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

Dois suportes de amostra compõem um calorímetro diferencial de varrimento, o primeiro para a amostra em si e o segundo como referência, normalmente vazio ou com um material inerte. O objetivo é, então, igualar o aumento de temperatura entre a referência e a amostra, variando, para isso, a quantidade de calor fornecida à amostra.

Estas variações, devidamente registradas, fornecem informação sobre a capacidade calorífica do material e sobre o calor envolvido nas transições, revelando assim propriedades termodinâmicas como a energia térmica total, entropia, estabilidade térmica e ainda o grau de cristalinidade da amostra.

Conhecimento sobre o grau de cristalinidade de um polímero é importante na medida que a cristalinidade afeta diretamente propriedades físicas como a permeabilidade, densidade, temperatura de fusão e comportamento na deformação. A cristalinidade de um polímero pode ser determinada por DSC através da quantificação do calor associado à fusão do polímero. Este calor é depois comparado ao calor de fusão de uma amostra do mesmo polímero, mas desta vez 100% cristalina, devolvendo assim um grau de cristalinidade (%) para a amostra em estudo.

Atualmente os equipamentos de TA permitem a realização de TG e DSC em simultâneo, com a vantagem de oferecerem condições experimentais idênticas, que permitem uma comparação direta dos dados obtidos [39][40]. O equipamento utilizado neste trabalho encontra-se representado na figura 2.1.



Figura 2.1 - Equipamento *STA 449 F3 Jupiter* da *NETZSCH*;

2.2 Difração de Raios-X

A Difração de Raios-X é uma técnica analítica não destrutiva, na qual é possível retirar informação sobre o padrão cristalino e características estruturais de um dado material.

Por um lado, tem-se: a) os materiais cristalinos, que são materiais sólidos com um arranjo atômico tridimensional organizado de forma periódica, e b) os materiais amorfos, que são materiais ausentes de periodicidade na sua estrutura atômica. Por outro tem-se a interação dos raios-X com estruturas cristalinas. A dispersão dos raios-X incidentes numa estrutura atômica periódica cria relações de fase muito bem definidas nos raios dispersos, que para a maioria das direções leva a interferência destrutiva. Contudo, para certas e raras direções, a interferência tem caráter construtivo, produzindo assim raios difratados [41].

Por exemplo: como é possível observar na figura 2.2, os Raios Incidentes 1 e 2 são refletidos pelos átomos A e C, e a diferença em distância entre o percurso [1; A; 1'] (trajeto a vermelho) e o percurso [2; C; 2''] (trajeto a azul) é descrita pela equação 2.1, onde θ_i e θ_r representam o ângulo de incidência e de reflexão, respetivamente.

$$BC + CD = d \sin \theta_i + d \sin \theta_r \quad \text{Equação 2.1}$$

Caso esta diferença em distância seja igual a um múltiplo do comprimento de onda da radiação incidente, então os Raios 1' e 2'' estarão em fase, como é visível na equação 2.2.

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad \text{Equação 2.2}$$

Esta relação é conhecida como a *lei de Bragg* onde λ é o comprimento de onda do feixe incidente, θ é o ângulo de *Bragg*, que corresponde ao ângulo formado entre o feixe de raios-X incidente (e difratado) e o plano da rede cristalina do material, d é o espaçamento periódico da estrutura cristalina, e por fim, n representa o número de reflexão [42].

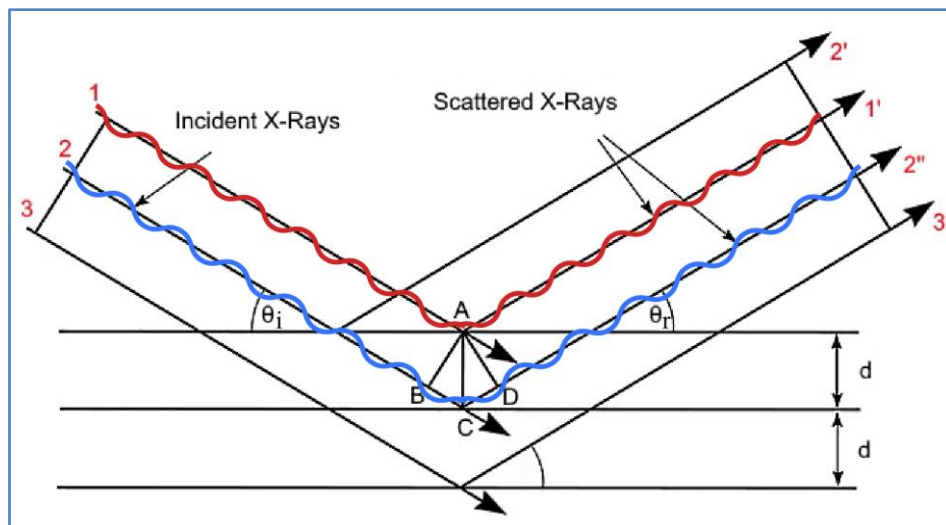


Figura 2.2 - Esquema do efeito da difração de raios-X num material com estrutura cristalina [43];

Através destas expressões, a técnica de difração de Raios-X permite-nos obter uma correlação entre a intensidade do feixe de raios-X difratado e o ângulo do feixe de raios-X incidente.

Para o propósito deste trabalho, foi utilizado o equipamento *X'Pert Pro* da *PANalytical* (Países Baixos) com uma ampola de cobre. O padrão de difração foi adquirido para ângulos entre os 10° e 90° (2 θ), com passos de 0,03° (em 2 θ).

2.3 Microscopia Eletrónica de Varrimento

Microscópios óticos convencionais são capazes de uma magnificação máxima à volta das 1000x, utilizando radiação com comprimento de onda no intervalo visível (400-700 nm). Contudo, para ampliações maiores, o comprimento de onda da radiação tem de ser menor do que o permitido pelo intervalo visível [44]. É comum pensar-se na luz como radiação eletromagnética com comprimento de onda λ , e nos eletrões como partículas subatômicas. Porém, as duas interpretações estão corretas para ambos os casos: a luz pode também ser descrita através de fótons, e os eletrões podem igualmente ser descritos como radiação eletromagnética com comprimento de onda entre os 0,001 e os 0,01 nm [45].

Efetivamente, os eletrões como radiação produtora de imagens permitem a visualização da topografia, constituição química, estrutura cristalina e comportamento elétrico de uma dada superfície, com resoluções inferiores a 1 nm. A esta técnica atribuiu-se o nome de Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM, do inglês *Scanning Electron Microscopy*).

O microscópio eletrónico de varrimento é composto por uma fonte de eletrões, um sistema de lentes, um tubo de raios catódico (CRT, do inglês *Cathode Ray Tube*), bobinas de varrimento e um coletor de eletrões (figura 2.3). Funciona através do varrimento da superfície da amostra com um feixe de eletrões. Os eletrões, ao penetrarem na amostra, interagem com os seus átomos e moléculas, resultando dessa interação 3 tipos de eletrões: (1) eletrões secundários, que são os utilizados numa imagem de SEM convencional, (2) eletrões de Auger e (3) eletrões retro difundidos, que são igualmente utilizados para formação de imagem. Em cada ponto bidimensional na amostra corresponderá um ponto no CRT, onde fica registada a medição de brilho desse ponto enquanto o feixe percorre a superfície toda da amostra [45].

Em SEM, o contraste varia com vários fatores. Para o caso da formação de imagens recorrendo a eletrões secundários, o maior influenciador do contraste é a topografia da superfície, enquanto que para as imagens formadas a partir de eletrões retro difundidos, o maior influenciador do contraste passa a ser o número atômico das partículas que compõem um material.

No âmbito deste trabalho utilizou-se o dispositivo *TM3030 Plus + Quantax 70*.

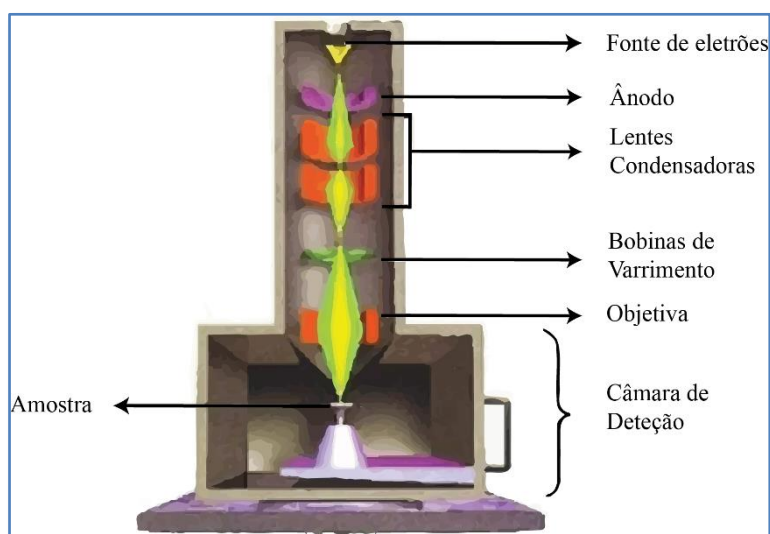


Figura 2.3 – Esquema da composição do Microscópio Eletrônico de Varrimento;

2.4 Porosimetria por Injeção de Mercúrio

A porosidade de um material afeta as suas propriedades físicas, tais como a sua permeabilidade, densidade e resistência ao impacto e à deformação. É possível então, através da caracterização da porosidade dos materiais, melhor compreender como é que esta influencia o seu destes.

Porosimetria é um termo que inclui a medição do tamanho, volume, distribuição e outras características de poros, sendo uma ferramenta analítica muito importante na compreensão da produção, estrutura e potenciais aplicações de certos substratos porosos.

Devido à força coesiva entre átomos de mercúrio (Hg) e consequente tensão superficial elevada, este elemento não molha a maioria das substâncias, logo não é capaz de penetrar poros de forma espontânea, por ação capilar. É necessário então aplicar uma pressão, que será inversamente proporcional ao tamanho dos poros. Isto é, grandes poros requerem pressões baixas, enquanto que poros de tamanho reduzido requerem pressões altas. A análise de porosimetria por injeção de Hg consiste assim na intrusão contínua de mercúrio numa estrutura porosa através do aumento controlado da pressão na câmara de análise, e é capaz de fornecer informação sobre, por exemplo, o volume total de poros, o volume de material e respetiva densidade, o volume intersticial vazio e a distribuição do volume dos poros por tamanho [46]. No contexto desta investigação utilizou-se o equipamento *AutoPore IV 9500* da *Micromeritics* (EUA), representado na figura 2.4.



Figura 2.4 - Porosímetro de mercúrio *AutoPore IV 9500* da *Micromeritics* (EUA) usado para determinar o diâmetro médio dos poros das membranas poliméricas;

2.5 Teste de Capilaridade

Como já foi referido no subcapítulo 1.2 acerca de microfluídica, ao lidar com poros na ordem dos micrómetros e volumes de líquido na ordem dos microlitros, a influência da força da gravidade perde significância em comparação com a influência da tensão superficial do fluido. De um ponto de vista prático, os espaços vazios aleatórios numa estrutura porosa funcionam como tubos capilares, o que significa que, no caso de a superfície do material ser hidrofílica, é possível conduzir líquidos pela matriz de uma estrutura porosa sem a aplicação de uma força externa.

Desta forma, e utilizando a vantagem das membranas poliméricas serem opacas e de cor clara, concebeu-se um teste que consiste em pipetar um pequeno volume de corante alimentar, dissolvido em água destilada (1:1 (v/v)) para uma das duas áreas circulares do canal polimérico, como representado na figura 2.5-A. Quando a membrana possui poros com características favoráveis a efeitos de capilaridade, é possível observar a olho nu o avanço da água corada na membrana (2.5-B2). Caso contrário, o volume de fluido permanece imóvel na área depositada (2.5-B1).

Com este teste, é possível avaliar a capacidade de uma membrana de conduzir fluidos por ação capilar, bem como ter uma estimativa da velocidade com que o fluido preenche o espaço livre na matriz da membrana.

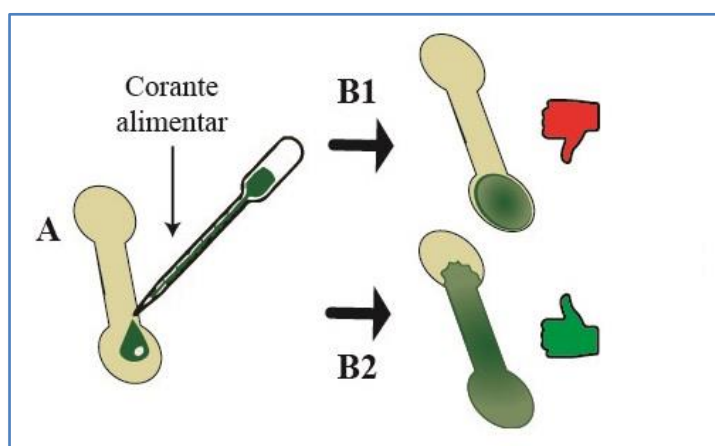


Figura 2.5 - Teste de capilaridade efetuado nos canais porosos. O corante é colocado num extremo do canal (A) e, caso o resultado seja negativo para fenómenos de capilaridade, o corante não avança (B1). Caso seja positivo, o corante molha o canal por completo (B2);

MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS

Discuta-se agora as diferentes ferramentas, matérias-primas e técnicas utilizadas ao longo deste trabalho, desde a produção do biopolímero que serve de base para os dispositivos em desenvolvimento, até às estratégias utilizadas no sentido de tornar o mesmo biopolímero adsorvente.

3.1 Preparação do Teste de Diagnóstico Colorimétrico

3.1.1 Produção de P(3-HB) e P(3HB-co-HV)

No âmbito deste trabalho, foram utilizados três polímeros diferentes:

- (1). P(3HB) extraído a partir da biomassa de uma cultura bacteriana pura;
- (2). P(3HB-co-HV) extraído a partir da biomassa de uma cultura mista;
- (3). P(3HB) comercial, extraído a partir da biomassa de uma cultura bacteriana pura, da empresa Biomer (Alemanha);

(1) Em primeira instância, produziu-se P(3HB), desde a incubação da cultura bacteriana até à extração do biopolímero.

Começou-se com o descongelamento de uma cultura de *Cupriavidus necator-DSM428*, e subsequente inoculação em 200 mL de meio Luria-Bertani (meio LB) (10 g/L triptona, 5 g/L extrato de levedura, 10 g/L NaCl), num Erlenmeyer de 500 mL, para reativação. Após 24 h num agitador orbital (30 °C, 200 rpm), transferiu-se a mistura para um biorreator de 2 L acoplado a um controlador de bancada (Biostat B plus, Sartorius, Alemanha), ambos apresentados na figura 3.1-A, em conjunto com 20 mL de solução mineral (5,8 g/L fosfato de dipotássio, 3,7 g/L fosfato de potássio monobásico, 3,3 g/L fosfato de diamônio) e água destilada até perfazer o volume inicial de 2 L. O crescimento da cultura aconteceu por 48h, alimentada a óleo alimentar usado

CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS

(OAU). O pH do caldo manteve-se neutro (7,0), através da adição controlada de NaOH (5 mol/L) e HCl (2 mol/L), usados como base e ácido, respetivamente. A pressão parcial de oxigénio na mistura foi controlada pela agitação (rpm) no biorreator. Como forma de conter a produção de espuma e evitar derrames e contágio, utilizou-se anti espuma.

O crescimento celular foi controlado ao longo do tempo através de ensaios de absorvância em amostras de caldo (3 mL) a 600 nm ($A_{600\text{ nm}}$). As amostras foram diluídas de modo a obter valores de $A_{600\text{ nm}}$ abaixo dos 0,3. Utilizou-se água destilada como zero de referência. Os ensaios de espectrofotometria foram realizados em duplicado, com o equipamento na figura 3.1-B. Esta análise baseia-se no princípio de que a concentração na solução da substância absorvente é proporcional à quantidade de luz absorvida, e permite escolher a altura ótima para cessar a atividade no biorreator.



Figura 3.1 – (A) Biorreator de vidro e controlador de bancada Biostat B plus, comercializado pela Sartorius; (B) Espectrofotómetro UV/Visível V-1200, comercializado pela VWR;

Deste processo resultaram cerca de 2 litros de caldo, que foram centrifugados (8000 rpm, 8 min, 4 °C) utilizando o aparelho na figura 3.2-A, de forma a separar a biomassa do sobrenadante. A biomassa centrifugada foi posteriormente colocada em um recipiente e congelada a -80 °C.

A biomassa seca (20,16 g) foi sujeita a uma extração de Soxhlet com clorofórmio (100 mL), durante 48 horas. Ao longo da extração, a temperatura do clorofórmio foi mantida entre os 80 °C e os 90 °C com o auxílio de um banho de óleo.

Após a extração, a solução de polímero em clorofórmio foi deixada na *hotte* para evaporação completa do solvente. Não foi realizado o passo de purificação por precipitação em

3.1 PREPARAÇÃO DO TESTE DE DIAGNÓSTICO COLORIMÉTRICO

etanol frio, pois para a aplicação em vista o polímero apresentava-se numa forma suficientemente pura.

(2) Foi também utilizada biomassa de uma cultura mista, contendo P(3HB-*co*-HV), obtida pelo processo de fome-e-fartura, conforme descrito por [47] utilizando polpa de maçã residual como substrato. Esta biomassa (5,32 g) foi cedida pelo grupo de investigação BioEng (Instalação Piloto) e foi sujeita a extração por Soxhlet em 50 mL de clorofórmio, em conformidade com o explicado anteriormente. Após a extração, adicionou-se clorofórmio à solução de polímero até perfazer 50 mL e, com uma seringa, precipitou-se a solução gota a gota em etanol frio, numa proporção de 1:10 (v/v), com o objetivo de obter o polímero mais puro.

(3) Paralelamente, foi também utilizado um polímero comercial, o P(3HB) (Biomer, Alemanha) produzido por uma cultura pura de *Alcaligenes latus*, com sucrose como alimento e extraído com solvente e purificado por injeção do solvente em água, que precipita o polímero [48]. Este polímero foi obtido sob a forma de um pó branco muito fino, como é visível na figura 3.2-B.

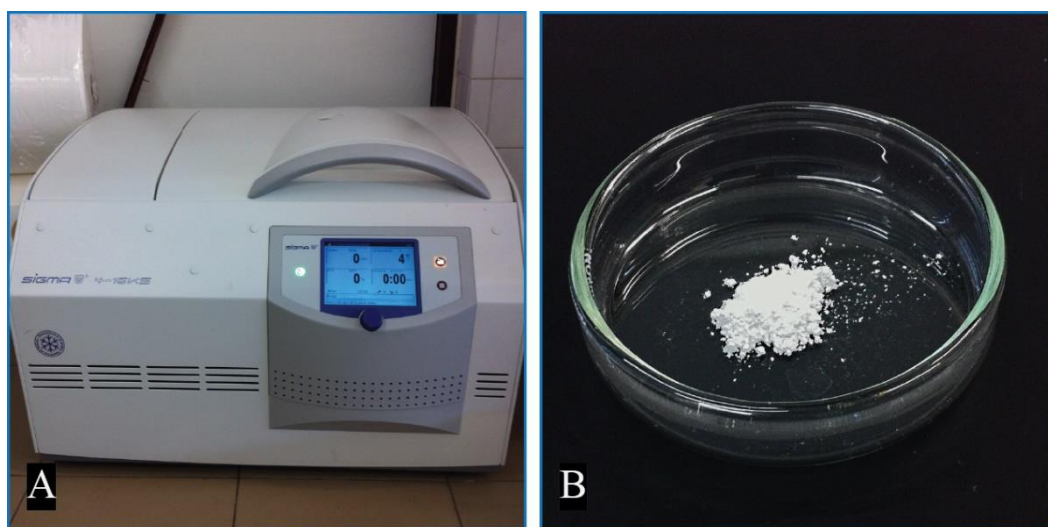


Figura 3.2 – (A) Centrífuga Sigma 4-16KS; (B) P(3HB) em pó, comercializado pela empresa Biomer;

3.1.2 Produção de Membranas Adsorventes

Inserido neste subcapítulo encontram-se então descritas as técnicas de fabricação de membranas poliméricas porosas examinadas ao longo deste trabalho:

3.1.2.1 LIXIVIAÇÃO COM SAL

Esta técnica pode ser adaptada ao problema em questão, e possui a potencialidade de criar, a baixo custo, membranas altamente porosas a partir de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis.

CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS

Começou-se pela preparação de uma solução de biopolímero em clorofórmio (3% (m/m)) agitada durante 24h, a 60 °C. Baseado em parte nos métodos descritos em [37] e [49], adicionaram-se cristais de NaCl à dissolução numa razão de 60/40 (NaCl/polímero) (m/m), se como encontra representado nas figuras 3.3-A e 3.3-B. Agitou-se a mistura com o auxílio de uma barra magnética, à temperatura ambiente, por pelo menos 10 minutos. Depois de formada uma pasta viscosa, esta foi vertida para uma placa de Petri de vidro (75 mm diâmetro) (figura 3.3-C).

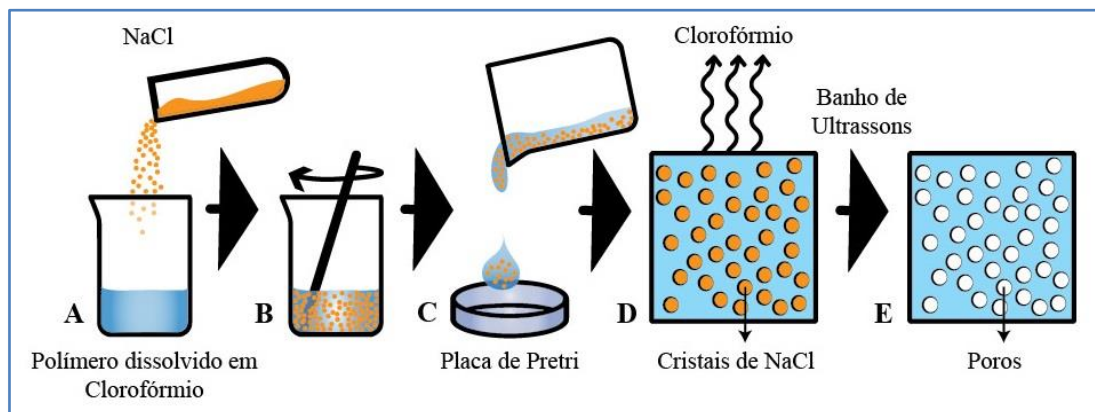


Figura 3.3 - Esquema passo a passo da produção de membranas porosas através da Lixiviação com Sal, onde os cristais de NaCl são misturados na dissolução de polímero em clorofórmio, e a mistura vertida numa placa de Petri. Após evaporação do clorofórmio, os cristais são lavados com água destilada;

O pó de NaCl utilizado foi peneirado manualmente com recurso a uma peneira metálica de rede quadrada e abertura nominal igual a 106 μm . De modo a evitar o contacto com humidade e consequente agregação do pó, este foi conservado num tubo selado, por sua vez dentro de um copo com tampa em conjunto com gel de sílica.

A placa de Petri com a solução é então colocada num exsiccador e deixado por 48h na *hotte* à temperatura ambiente, para evaporação completa do solvente (figura 3.3-D). Uma vez seca, a membrana é lavada com água destilada (100 mL) por três vezes, à temperatura ambiente, no banho de ultrassons. A água foi renovada entre lavagens e cada lavagem teve a duração de 15 minutos. Finalmente as membranas são deixadas na *hotte* por 12h, até secarem completamente. Como o polímero é insolúvel em água, resulta uma matriz porosa (figura 3.3-E).

Uma alternativa a este procedimento, conforme é descrito em [34], foi a colocação de uma camada de cristais de NaCl (aproximadamente 3 g) no fundo da placa de Petri, e posteriormente verter 10 mL de solução de polímero em clorofórmio (3%) (m/m) sobre a referida camada (figura 3.4-A e 3.4-B). Por ação da gravidade, a solução preenche os espaços vazios entre os grãos de sal, envolvendo-os, como é visível na figura 3.4-C. Posteriormente os moldes são colocados no interior de um exsiccador, que é deixado na *hotte* por 48h para evaporação completa

3.1 PREPARAÇÃO DO TESTE DE DIAGNÓSTICO COLORIMÉTRICO

do solvente (figura 3.4-D). Após a evaporação do clorofórmio, as membranas são submetidas ao processo de lavagem com recurso a banho de ultrassons descrito anteriormente (figura 3.4-E).

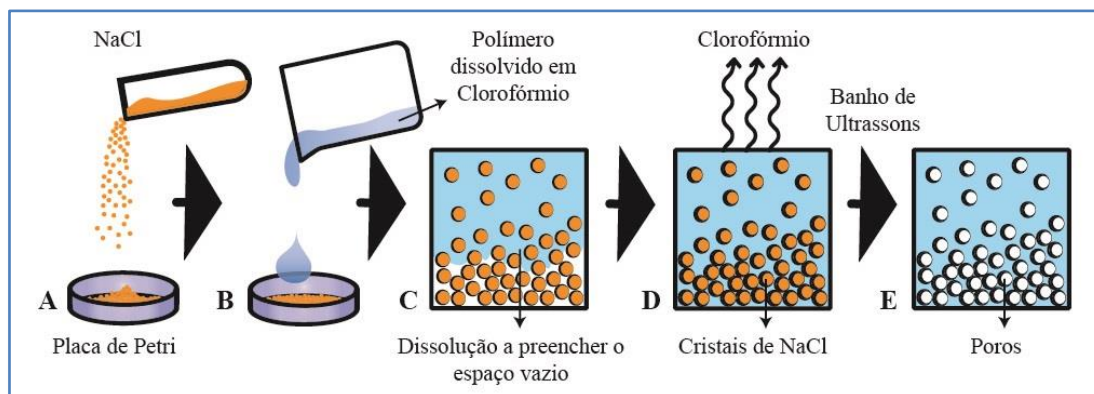


Figura 3.4 - Esquema passo a passo da produção de membranas porosas através da Lixiviação com Sal onde a dissolução de polímero em clorofórmio é vertida diretamente sobre os cristais de NaCl. Após evaporação do clorofórmio, os cristais são lavados com água destilada;

É relevante ainda mencionar que, dentro da técnica de lixiviação com sal, e seguindo a literatura no assunto [37], é possível utilizar esta técnica recorrendo a altas temperaturas como forma de fundir o polímero e “aprisionar” os cristais de sal, em vez de o dissolver em clorofórmio, como está representado no esquema da figura 3.5.

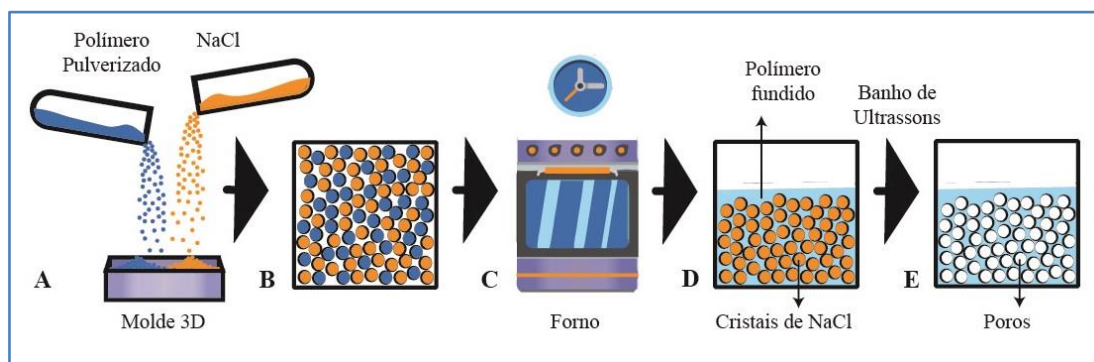


Figura 3.5 - Esquema passo a passo da produção de membranas porosas através da Lixiviação com Sal onde os cristais de NaCl são misturados com o pó de polímero, e a mistura é aquecida num forno ou prensa. Após arrefecida, a membrana é lavada com água destilada de forma a remover os cristais de NaCl;

Para tal o biopolímero e os grãos de NaCl foram triturados e peneirados. Uma vez obtidos os pós de dimensões controladas (100-180 μm para o pó de polímero e 350-400 μm para o pó de NaCl) [37], estes foram misturados (polímero/NaCl = 40/60) (m/m) num molde de cerâmica resistente a altas temperaturas, de dimensões 10x2x1,5 cm ou 9x1x1 cm, visíveis na figura 3.6-A. Por sua vez o molde foi aquecido num forno (figura 3.6-B) ou prensa (3.6-C), a uma temperatura superior à temperatura de fusão do polímero, mas inferior à temperatura de degradação do mesmo.

CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS

Após tempo suficiente no forno (no mínimo 15 minutos) para o polímero fundir completamente, a membrana foi arrefecida até à temperatura ambiente, e efetuou-se o procedimento de lixiviação dos cristais de sal.

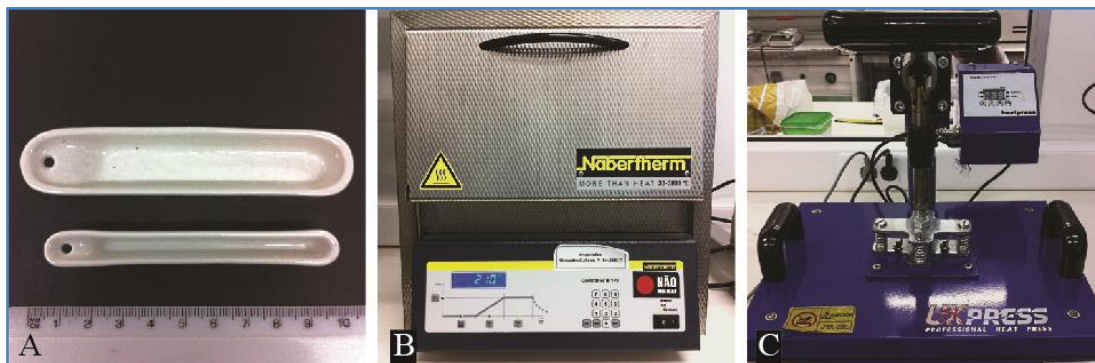


Figura 3.6 – (A) cadinhos em cerâmica resistentes a altas temperaturas utilizados em mufla; (B) mufla elétrica L 3/12 da Nabertherm (Alemanha); (C) prensa térmica Heatpressuk (Reino Unido);

3.1.2.2 EMULSÃO DE ÁGUA EM CLOROFÓRMIO

Através da criação de uma emulsão entre fluídos imiscíveis é possível produzir matrizes porosas a partir de diversos materiais com distribuições de tamanhos de poros muito bem definidas. No presente trabalho é proposta a utilização desta técnica evitando, contudo, a utilização de emulsionantes, técnicas de polimerização ou reagentes de custo elevado.

Para tal, utilizou-se 10 mL de solução de biopolímero a 3% (m/m) em clorofórmio, num copo de vidro destapado, e adicionou-se 1 mL de água destilada (figura 3.7-A). A mistura foi agitada vigorosamente durante 1 hora e 30 minutos, à temperatura ambiente, com recurso a uma barra magnética e uma placa de aquecimento com agitação (figura 3.7-B).

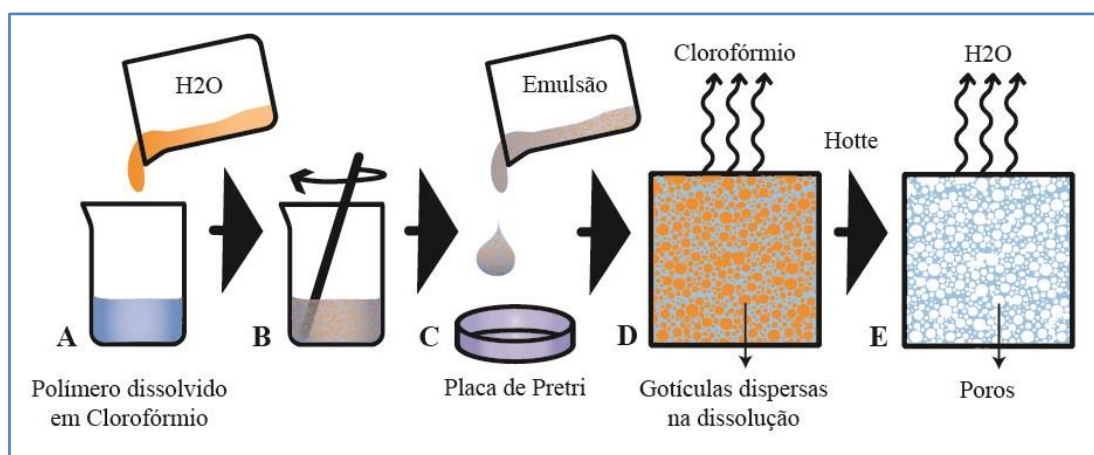


Figura 3.7 - Esquema passo a passo da produção de membranas porosas através da uma emulsão de água em polímero dissolvido em clorofórmio;

3.1 PREPARAÇÃO DO TESTE DE DIAGNÓSTICO COLORIMÉTRICO

Depois, a emulsão foi transferida para uma placa de Petri de vidro (75 mm de diâmetro) e deixada na *hotte* coberta com folha de alumínio, à temperatura ambiente, por 48h, de modo a evaporar o conteúdo de clorofórmio e de água (figuras 3.7-C, 3.7-D e 3.7-E).

3.1.2.3 TRATAMENTO COM RADIAÇÃO UV E OZONO (UV – O₃)

Idealmente concebido para a remoção de contaminantes orgânicos, o tratamento com UV-O₃ é uma técnica muito utilizada em nanotecnologia para o tratamento de substratos. É um procedimento a seco simples de montar e operar, de baixo custo, que consegue em pouco tempo produzir superfícies próximas do atómicamente limpas [50].

Através de uma lâmpada, geralmente de descarga de mercúrio, radiação UV de dois comprimentos de onda (185 nm e 254 nm) é produzida reagindo em dois estágios com o oxigénio (O₂) presente na câmara [43]:

(1) a radiação de comprimento de onda igual a 185 nm provoca dissociação do O₂. Os fragmentos resultantes combinam com o O₂ não dissociado para formar ozono (O₃);

(2) a radiação de comprimento de onda igual a 254 nm interage com o O₃ para formar uma espécie reativa de oxigénio. Esta espécie reativa, por sua vez, reage com os contaminantes orgânicos presentes na superfície;

Aplicando os efeitos descritos a polímeros, ou seja, com tratamento de UV/O₃, é possível obter uma degradação controlada da sua superfície, modificando algumas das suas propriedades. É de salientar que esta técnica, ao contrário das anteriores, não é capaz de criar poros nas membranas poliméricas, apenas de melhorar a molhabilidade da sua superfície. No âmbito deste trabalho utilizou-se o equipamento *novascan* (*Novascan Technologies, Inc. EUA*), visível na figura 3.8.



Figura 3.8 – Equipamento de tratamento com radiação UV e O₃ *novascan PSD Pro Series* (*Novascan Technologies, Inc. EUA*);

CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS

As membranas submetidas a este tratamento foram produzidas por evaporação de solvente, a partir de P(3HB) e P(3HB-co-HV), em placas de Petri com 75 mm de diâmetro. Utilizaram-se também membranas obtidas por lixiviação de sal e evaporação de solvente.

Deu-se uso a duas técnicas diferentes de padronização das zonas de deposição e do canal de condução:

(1) A primeira com recurso a máscaras de fita de kapton adesiva (*KPT-2485, pro-POWER*), cortada com auxílio do equipamento de laser *Universal Laser System (ULS) VLS3.5*. As máscaras foram colocadas sobre a membrana polimérica e posteriormente submetidas ao tratamento UV/O₃, por 120 minutos, como é perceptível nos passos A e B da figura 3.9.

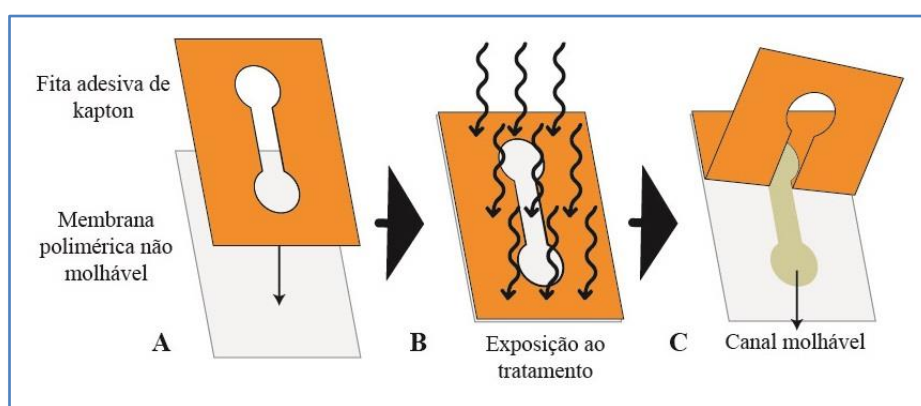


Figura 3.9 - Esquema da produção de canais hidrofílicos através do tratamento com UV/O₃ e plasma de O₂, recorrendo a uma máscara de fita adesiva de kapton;

(2) A segunda recorrendo igualmente ao corte a laser da geometria pretendida mas, desta vez, diretamente na membrana polimérica, submetendo apenas o canal já cortado aos 120 minutos de tratamento com UV/O₃ (figura 3.10).

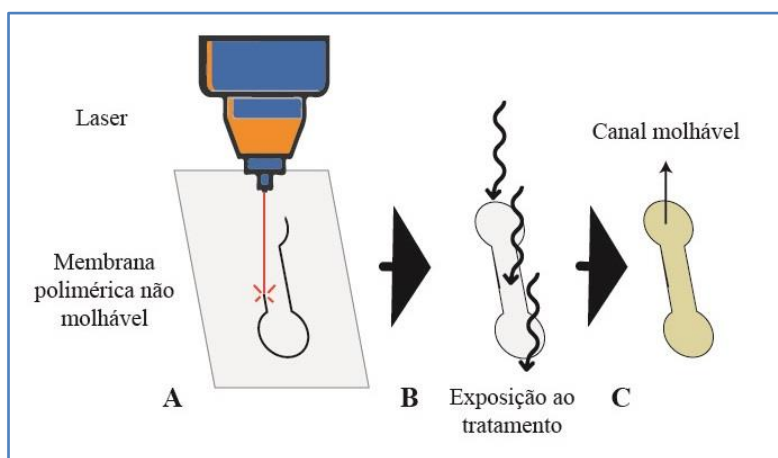


Figura 3.10 - Esquema da produção de canais hidrofílicos através do tratamento com UV/O₃ ou plasma de O₂, com o auxílio do laser;

3.1 PREPARAÇÃO DO TESTE DE DIAGNÓSTICO COLORIMÉTRICO

As geometrias escolhidas foram dimensionadas com recurso a um *software* de desenho auxiliado, o *CAD-Adobe Illustrator*.

3.1.2.4 TRATAMENTO COM PLASMA DE OXIGÉNIO

Outra abordagem para a alteração da molhabilidade da superfície hidrofóbica do polímero consiste na exposição da membrana a plasma de oxigénio em condições de pressão baixa. Utilizaram-se membranas produzidas por evaporação de solvente, com e sem lixiviação de cristais de NaCl. As membranas foram submetidas ao tratamento através da utilização de máscaras de fita de kapton e através do corte dos canais com recurso a tecnologia de laser, como ilustram novamente as figuras 3.9 e 3.10, respetivamente.

No âmbito deste trabalho utilizou-se a unidade de tratamento de plasma representada na figura 3.11.



Figura 3.11 - Equipamento *Zepto Low Cost Plasma Laboratory Unit*, comercializado pela *Diener Electronics* (Alemanha);

3.1.3 Sistema de Detecção Colorimétrica de Glucose

Os dispositivos de fluxo lateral para deteção colorimétrica de glucose foram dimensionados segundo a ilustração da figura 3.12.

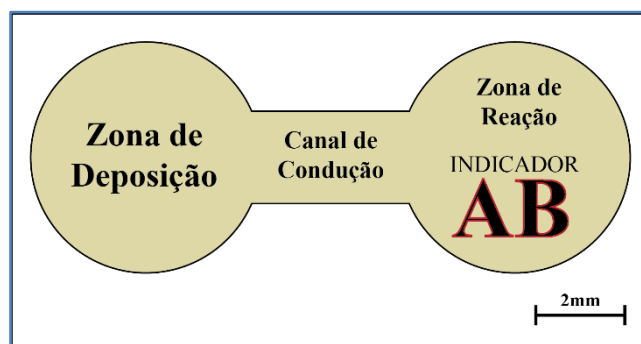


Figura 3.12 - Disposição da zona de deposição, canal de condução e zona de reação no biossensor de glicose;

Uma vez produzida a membrana porosa através de uma das técnicas referidas acima (figura 3.13-A), os canais foram expostos a um tratamento de modificação de superfície (tratamento com UV/O₃ ou tratamento com plasma de O₂) (figuras 3.13-C1 e 3.13-C2), que tornam o canal adsorvente.

Posteriormente, o sistema de detecção colorimétrica de glicose foi incorporado no canal (figura 3.13-D). Em primeiro lugar, o indicador AB (mistura de rácio molar 1:2 de 4-aminoantipirina e ácido 3,5-dicloro-2-hidroxi-benzenosulfínico de sódio com concentrações de 4mM e 8mM, respetivamente) foi preparado e colocado na Zona de Deposição.

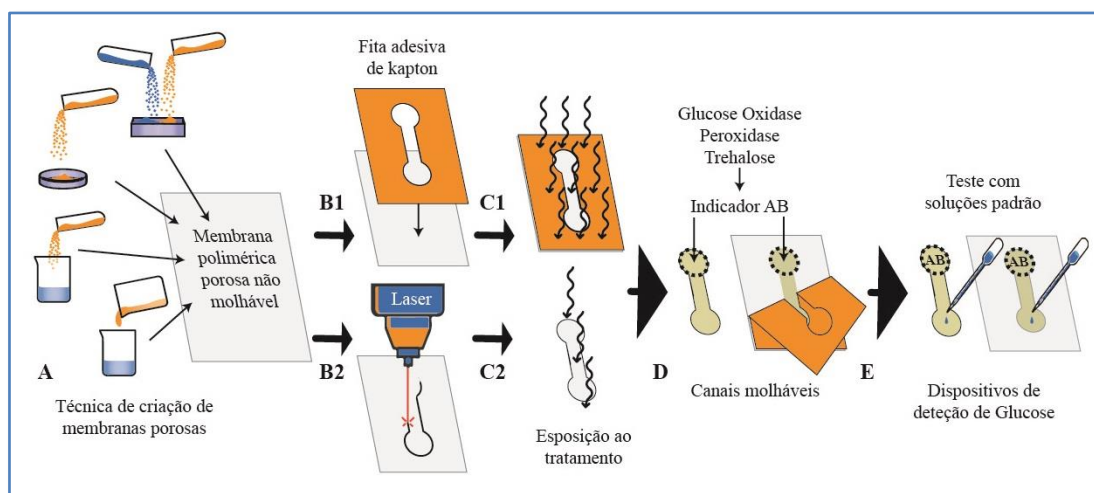


Figura 3.13 - Esquema passo a passo da produção de dispositivos de detecção de Glucose;

Após a secagem do indicador, foram depositados sobre este 2 μL de uma solução enzimática (glucose oxidase, peroxidase e trehalose, com concentrações de 645 U.mL^{-1} , 339 U.mL^{-1} e 0,3 M, respetivamente, numa solução tampão de pH 6,0). Por fim prepararam-se 7 soluções (tabela 3.1) padrão de glucose para o teste e calibração dos dispositivos (figura 3.13-E).

3.1 PREPARAÇÃO DO TESTE DE DIAGNÓSTICO COLORIMÉTRICO

Os resultados colorimétricos obtidos foram digitalizados e processados com recurso a um *software* de tratamento de imagem *ImageJ*.

Tabela 3.1 - Soluções padrão utilizadas na calibração dos dispositivos de deteção de glucose;

#	Concentração de Glucose (mM)	#	Concentração de Glucose (mM)
1	0.5	5	6.0
2	1.0	6	8.0
3	2.0	7	10.0
4	4.0	-	-

APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos em cada passo do processo de criação de biossensores para detecção de glucose, através dos métodos de caracterização descritos no segundo capítulo. Adicionalmente são apresentados os resultados obtidos através das experiências laboratoriais, em conjunto com algumas considerações e conclusões.

4.1 Produção de P(3HB) e (P(3HB-*co*-HV)

A produção de P(3HB) a partir de uma cultura de *Cupriavidus necator-DSM428*, alimentada a OAU em um biorreator de vidro, resultou em aproximadamente 2 L de caldo. Deste volume de caldo extraíram-se 20,16 g de biomassa, após separação por centrifugação e posterior liofilização (desidratação a frio), com um rendimento de 10,34 g/L. Realizou-se uma extração de Soxhlet em 100 mL de clorofórmio, durante 24h, e dividiu-se a solução resultante por 5 copos de vidro de 100 mL. Estes foram deixados na *hotte* cobertos com folha de alumínio por 48h, para evaporação completa do solvente. Finalmente pesaram-se 5,88 g de P(3HB), indicando, com algumas aproximações, que a capacidade de acumulação de polímero pelas bactérias, em peso celular, foi de aproximadamente 29%. Comparando com a literatura vemos que este valor, embora reduzido, encontra-se dentro dos intervalos registados [51]. O P(3HB) foi obtido sob a forma de membranas finas, flexíveis, semitranslúcidas e com um tom amarelado (figura 4.1-A).

Já no caso do P(3HB-*co*-HV), começou-se com 5,32 g de biomassa liofilizada. Realizou-se uma extração de Soxhlet em 50 mL de clorofórmio, por 24h. À solução resultante foi realizada uma precipitação gota a gota em etanol frio, numa razão de 1:10 (solução polimérica/etanol) (v/v). O precipitado foi extraído com pinças metálicas e deixado a secar por 12h na *hotte*, à temperatura ambiente. Desta precipitação resultaram 2,16 g de P(3HB-*co*-HV), sob a forma de novelos fibrosos (figura 4.1-B), com um rendimento, em peso celular, de aproximadamente 41%.

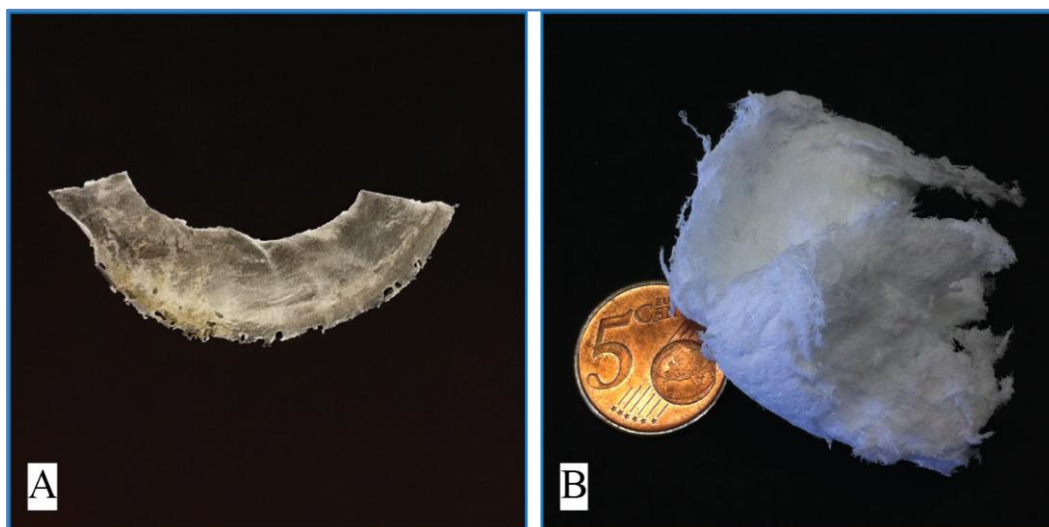


Figura 4.1 – (A) P(3HB) produzido a partir de OAU, sob a forma de membrana fina; (B) P(3HB-co-HV) produzido a partir de polpa de maçã residual, na sua forma fibrosa;

4.2 Caracterização do P(3HB) e do P(3HB-co-HV)

Antes da realização do estudo da produção de estruturas porosas a partir de P(3HB) e P(3HB-co-HV), procedeu-se à análise e caracterização destes biopolímeros, utilizando os métodos experimentais subsequentes.

4.2.1 Análise Termogravimétrica e Calorimetria Diferencial de Varrimento

Foi realizada a análise TG/DSC de modo a obter as propriedades térmicas dos polímeros em estudo. Como foram utilizadas técnicas de produção de membranas porosas que envolvem uma fase de aquecimento, esta análise tornou-se essencial para a determinação de transições e estabilidade térmica de cada polímero. Assim possibilita a melhor manipulação das condições de produção, transporte e armazenamento dos dispositivos de diagnóstico rápido desenvolvidos.

As amostras foram submetidas a um aquecimento contínuo (taxa de aquecimento constante) desde a temperatura ambiente até aos 550 °C, sob uma atmosfera de azoto, com registo simultâneo do fluxo de calor transmitido à amostra (mW/mg) e da respetiva variação de massa (%), como é possível observar nas figuras 4.2, 4.3 e 4.4.

Começando pela caracterização do P(3-HB) produzido a partir de OAU, utilizou-se uma amostra de membrana com 0,1 g, obtida por evaporação de solvente. É possível observar no gráfico da figura 4.2 um pico endotérmico bem pronunciado aos 174 °C, que corresponde à temperatura de fusão (T_m , do inglês *melting temperature*) do polímero. Este valor encontra-se muito próximo do descrito na literatura [18][52].

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO P(3HB) E DO P(3HB-CO-HV)

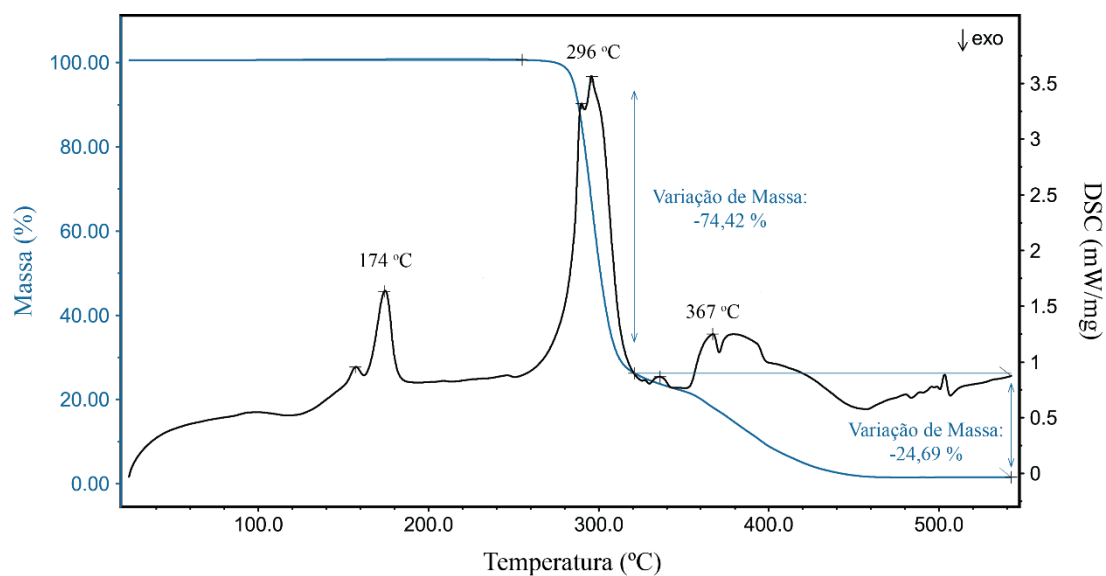


Figura 4.2 - Análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varrimento para o P(3HB) produzido a partir de UCO;

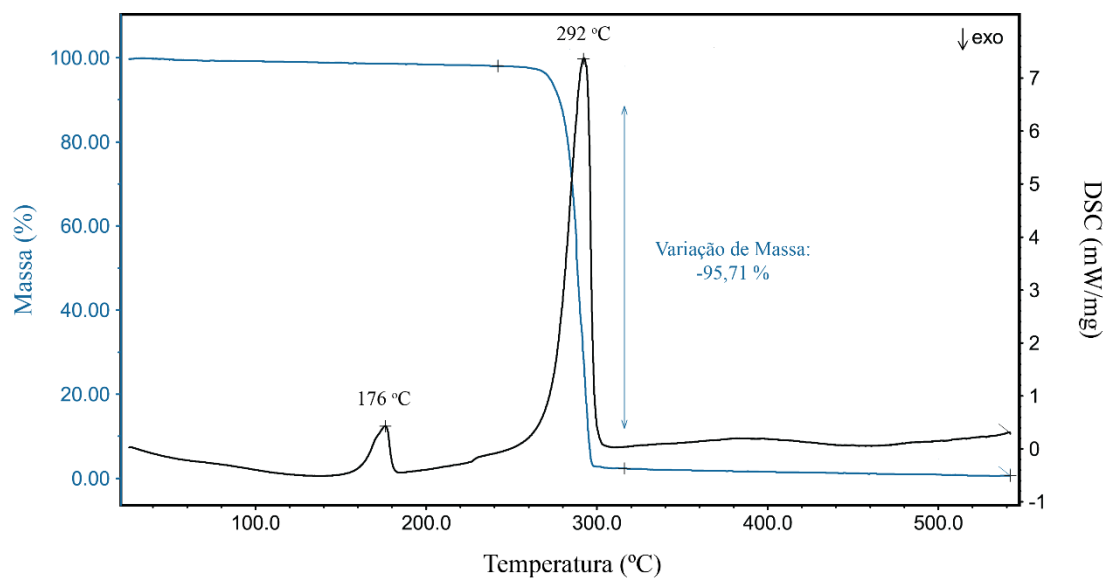


Figura 4.3 - Análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varrimento para o P(3HB) comercial da Biomer;

Para temperaturas mais elevadas, entre os 250°C e os 320°C, aproximadamente, observa-se uma perda de massa significativa, o que aponta para o intervalo onde o polímero degrada. Durante este intervalo o polímero completou uma perda de massa de 74%.

Como consequência desta análise, conclui-se que o P(3HB) pode ser moldado para temperaturas acima da T_m (174°C) e abaixo de 250°C, de modo a derreter o polímero sem o deteriorar.

CAPÍTULO 4: APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Comparando este resultado ao do P(3HB) Biomer (figura 4.3), identificam-se os picos de fusão e de degradação térmica muito semelhantes ($T_m = 176^\circ\text{C}$ e temperatura de degradação igual a 292°C). Contudo, é notória uma diferença fundamental na definição (largura) dos picos, bem como no número de picos identificados. Este resultado possivelmente aponta para o baixo grau de pureza do polímero obtido a partir de OAU, quando comparado com o polímero comercial. Isto porque os diferentes picos presentes na figura 4.2 que não se repetem no gráfico da figura 4.3, correspondem a transições térmicas provocadas por impurezas no polímero.

Segundo Laycock et al. [53], a temperatura de fusão e de transição vítrea do P(3HB) varia entre os 162 e 181°C e os -4 e 18°C , respetivamente. Como tal, o DSC realizado entre os 20 e os 550°C não nos fornece informação sobre a temperatura de transição vítrea e, consequentemente, não é possível calcular o grau de cristalinidade do polímero a partir da análise térmica.

No caso do P(3HB-co-3HV), visível no termograma da figura 4.4, observa-se que a temperatura de fusão é de aproximadamente 151°C . Segundo a literatura, este valor de temperatura de fusão corresponde a um copolímero de P(3HB-co-HV) com 17 mol% 3HV [51]. Este valor é inferior ao valor da temperatura de fusão do P(3HB) devido à presença de monómeros 3HV na sua composição [54]. Quanto à temperatura de degradação deste polímero, esta acontece a uma temperatura ligeiramente mais baixa do que o P(3HB) (281°C), com uma perda de massa de 98,94%.

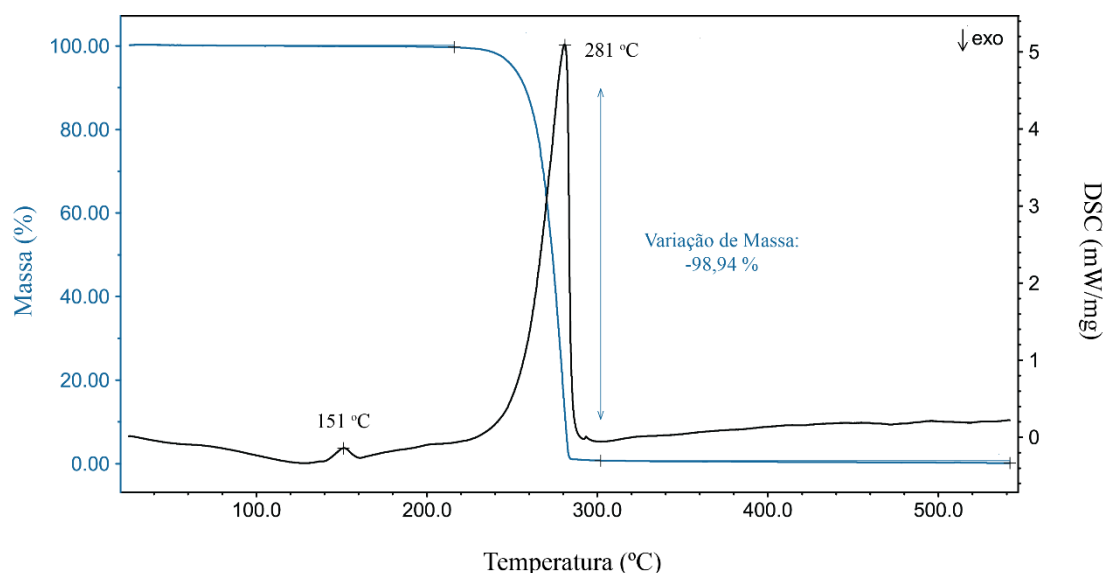


Figura 4.4 - Análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varrimento para o P(3HB-co-3HV) produzido a partir de polpa de maçã residual;

4.2.2 Difração de Raios-X

A difração de raios-X foi uma ferramenta essencial na caracterização da fase cristalina do P(3HB) produzido a partir de OAU, do P(3HB) da Biomer e do P(3HB-co-HV). Sendo que a cristalinidade está intimamente relacionada com as propriedades físicas de um polímero, como a dureza e flexibilidade, enfatiza-se aqui a importância da realização deste teste de caracterização.

Nas figuras 4.5-A e 4.5-B são apresentados os difratogramas de um filme de P(3HB) obtido a partir de OAU e de um filme de P(3HB) comercial (Biomer), respectivamente.

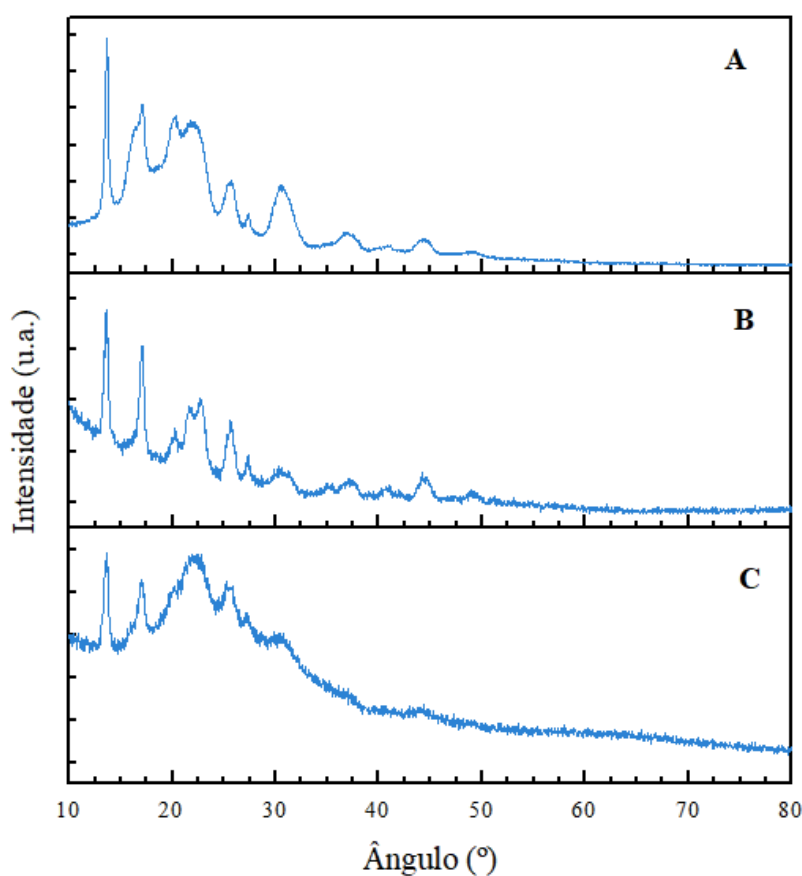


Figura 4.5 - Difratograma dos polímeros: (A) P(3HB) produzido a partir de OAU; (B) P(3HB) Biomer; e (C) P(3HB-co-HV) produzido a partir de polpa de maçã residual;

É possível identificar, em ambos os gráficos, vários picos de difração para ângulos bem definidos. Estes picos de difração apontam para a presença de regiões nos filmes poliméricos organizadas tridimensionalmente, ou seja, cristalinas. Através da análise da posição angular do reflexo dos planos cristalográficos (110) e (020) ($2\theta = 13,65^\circ$ e $16,75^\circ$) e do plano (002) ($2\theta = 30,62^\circ$), que estão muito em conformidade com a literatura [54]–[56], é seguro concluir que os filmes P(3HB) estudados correspondem a polímeros com fase cristalina à base de 3HB, organizada segundo um sistema cristalino ortorrômbico [21]. Contudo, é notória uma diferença entre os gráficos, nomeadamente ao nível da largura e intensidade relativa de certos picos.

CAPÍTULO 4: APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Comparando o difratograma do P(3HB) obtido a partir de OAU (figura 4.5-A) com o difratograma do P(3HB) Biomer (figura 4.5-B), é perceptível uma diferença em largura no pico de difração $2\theta = 16,75^\circ$, sendo este menos intenso e menos definido para a figura 4.5-A.

Uma possível explicação é o facto de o P(3HB) produzido a partir de OAU, após a sua extração, não ter sido precipitado em etanol frio que, segundo Dobrovol'skaya et al. [55], promove a formação de uma estrutura cristalina mais desenvolvida e com menor número de defeitos. A precipitação permite igualmente a purificação do conteúdo polimérico, deixando as impurezas dissolvidas no etanol. Consequentemente os picos de difração resultariam menos difusos e mais intensos, como é o caso do P(3HB) da Biomer, de elevada pureza e cristalinidade (60-70%).

No caso do P(3HB-co-3HV), visível no difratograma C da figura 4.5, é perceptível a existência de dois picos, nas posições angulares $13,61^\circ$ e $17,03^\circ$, que correspondem aos reflexos dos planos cristalográficos (020) e (110), respetivamente. Estes picos são reflexões da estrutura periódica ortorrômbica do material, o que permite a identificação da natureza cristalina do biopolímero e comparação com análises semelhantes (Rodrigues et al. [57]). O difratograma do P(3HB-co-HV) apresentou-se em conformidade com a literatura.

4.2.3 Microscopia Eletrónica de Varrimento

Utilizou-se a técnica de SEM para revelar informação morfológica relativa às membranas de P(3HB). Serve também como referência de comparação para as diferentes técnicas de produção de estruturas porosas.

Na figura 4.6 encontram-se as imagens de SEM das membranas produzidas a partir de cada polímero estudado. Estas membranas foram produzidas utilizando 10 mL de solução de polímero a 3% (m/m) em clorofórmio, vertidos em uma placa de Petri de vidro (75 mm) e deixados na *hotte* durante 48h, para evaporação do solvente.

Através da comparação entre os 3 conjuntos de imagens observa-se uma diferença óbvia entre as membranas feitas de P(3HB) (figuras 4.6-A e 4.6-B) e a membrana de P(3HB-co-HV) (figura 4.6-C). Enquanto que a superfície do P(3HB) se apresenta como lisa e uniforme, a superfície do P(3HB-co-HV) apresenta irregularidades granulares e, em algumas regiões, são visíveis poros.

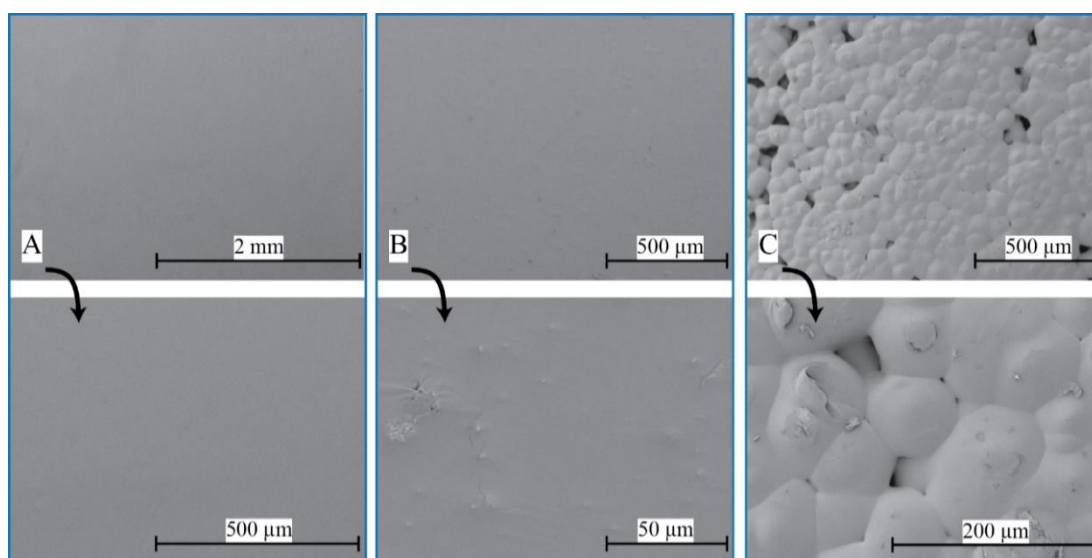


Figura 4.6 – (A) imagem de SEM de uma membrana de P(3HB) produzido a partir de OAU, criada por evaporação de solvente; (B) imagem de SEM de uma membrana de P(3HB) Biomer, criada por evaporação de solvente; (C) imagem de SEM de uma membrana de P(3HB-co-HV), criada por evaporação de solvente;

4.3 Produção de Membranas Porosas

4.3.1 Lixiviação com sal

Utilizou-se esta técnica de produção de estruturas porosas em duas vertentes, que diferem na forma como se manipula o polímero, (1) através da fusão do polímero ou (2) através de evaporação de solvente. Ambas procuram liquefazer o polímero e fazê-lo preencher o espaço vazio entre os cristais de NaCl, seja com recurso a clorofórmio, forno ou prensa.

Começando com a técnica de fusão do polímero, esta foi testada numa fase inicial do trabalho, utilizando unicamente o P(3HB) produzido a partir de OAU. Segundo este método produziram-se membranas porosas com distribuição de tamanhos de poros muito bem definidos, sem recorrer a solventes ou pressões altas. Assim também é possível produzir membranas mais porosas do que através de lixiviação convencional. Por exemplo, para uma razão de polímero/NaCl igual a 30:70 (v/v), resultam membranas com 80% de porosidade enquanto que, utilizando a técnica de lixiviação auxiliada por solvente, o mesmo grau de porosidade só é atingido para razões superiores a 20:80 (v/v) [37].

Segundo a literatura [37], uma das formas de homogeneizar a dispersão dos cristais de NaCl na membrana consiste em triturar e peneirar o polímero e o sal, misturando os dois antes de os submeter a elevadas temperaturas. Utilizou-se, sem sucesso, um moinho de café com o objetivo de fragmentar a membrana de P(3HB) e produzir um pó. Ao invés, a moagem deu origem a flocos

CAPÍTULO 4: APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

de polímero com dimensões superiores a 1 mm de diâmetro. Como alternativa, cortou-se o polímero com uma tesoura em fragmentos milimétricos (1x1 mm).

Utilizando a informação adquirida com a análise térmica do polímero, chegou-se à conclusão de que o intervalo de temperaturas ideal para a manipulação do P(3HB) se encontra entre os 174 e os 250 °C, um intervalo consideravelmente grande. Escolhendo uma temperatura neste intervalo, é garantido que se está acima da temperatura de fusão e abaixo da temperatura de degradação do biopolímero. Seguindo este raciocínio, e utilizando um forno e cadinhos de cerâmica com as dimensões 9x1x1 cm, produziram-se as membranas da figura 4.7.

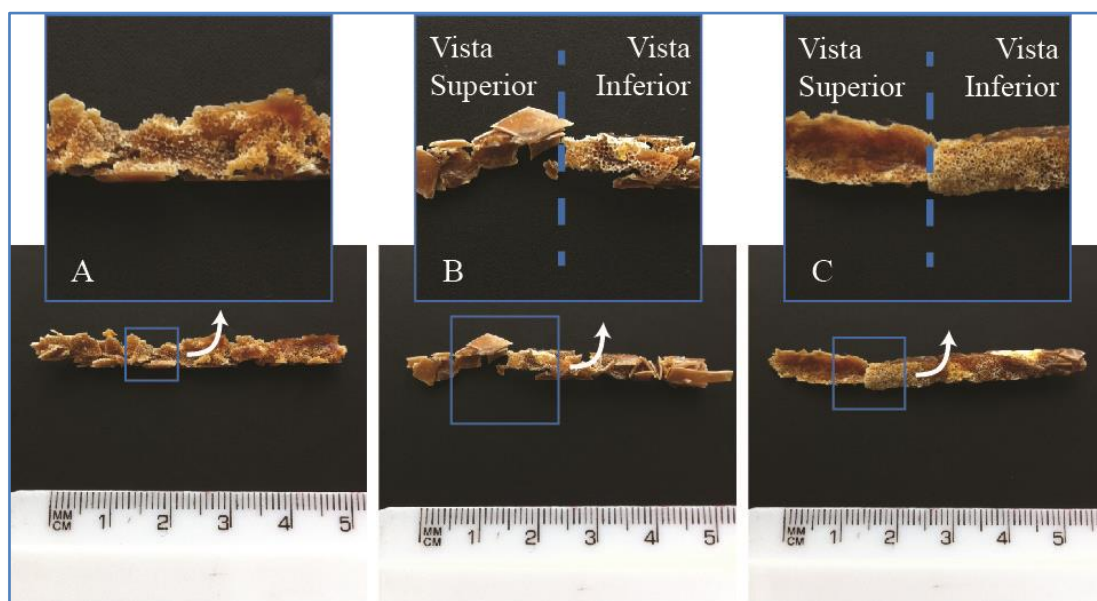


Figura 4.7 – (A) Membrana produzida por lixiviação com sal através da fusão em forno de P(3HB) misturado com NaCl ($m_{\text{polímero}}=0,51$ g, $m_{\text{sal}}=0,76$ g); (B) Membrana produzida por lixiviação com sal através da fusão em forno de P(3HB) misturado com NaCl, com aplicação de pressão na mistura à saída do forno ($m_{\text{polímero}}=0,50$ g, $m_{\text{sal}}=0,77$ g); (C) Membrana produzida por lixiviação com sal através da fusão em forno de P(3HB) sobre NaCl, com aplicação de pressão na mistura à saída do forno ($m_{\text{polímero}}=0,51$ g, $m_{\text{sal}}=0,76$ g);

A membrana da figura 4.7-A foi preparada utilizando 0,51 g de P(3HB) em conjunto com 0,76 g de NaCl, numa proporção de 40:60 (polímero/NaCl) (m/m). A massa de P(3HB) foi fragmentada com recurso a uma tesoura, e colocada no fundo do cadinho de cerâmica, coberta pelos cristais de NaCl. A membrana da figura 4.7-B deu uso à mesma proporção de massa de polímero por massa de NaCl (40:60) (m/m), com 0,50 g de P(3HB) e 0,77 g de pó de NaCl.

Semelhante à membrana da figura 4.7-A, os cristais de sal foram colocados em cima do polímero. Já no caso da membrana da figura 4.7-C, mantendo igualmente a proporção entre polímero e NaCl (40:60) (m/m), colocaram-se os cristais de sal no fundo do cadinho e os flocos de P(3HB) sobre os cristais. Utilizou-se 0,51 g de P(3HB) e 0,76 g de NaCl. Estas membranas foram aquecidas desde a temperatura ambiente (25 °C) até aos 190 °C, ao longo de 16 minutos

(10,3 °C.min⁻¹), ficando expostos à temperatura máxima durante 15 minutos. Uma vez terminado o protocolo de aquecimento, aplicou-se pressão nos moldes das membranas das figuras 4.7-B e 4.7-C, no sentido de comprimir o conteúdo do cadinho de cerâmica e melhorar a difusão do polímero fundido pelos espaços livres entre os cristais de NaCl. Após arrefecidas até à temperatura ambiente, as membranas foram submetidas a 3 lavagens de 15 min no banho de ultrassons, em 150 mL de água destilada. O volume de água foi renovado entre cada lavagem.

Como é possível observar, as membranas mostram algum nível de incorporação de sal, visível em algumas partes da sua superfície. Contudo, vários pontos negativos se destacam, como por exemplo o facto de grande parte dos flocos de P(3HB) permanecerem intactos após o processo térmico. A temperatura máxima escolhida (190 °C), embora superior à temperatura de fusão do polímero, não foi suficiente para o derreter completamente, dando origem às estruturas parcialmente fundidas visíveis na figura 4.7. Uma possível explicação para este resultado é o estágio a 190 °C ser demasiado breve. Ainda que o ar no interior do forno esteja à temperatura desejada, o aquecimento do polímero até essa mesma temperatura, que no forno acontece maioritariamente por radiação [58], pode requerer maior duração que os 15 min testados. Por outro lado, a temperatura escolhida deu origem à coloração do polímero. Como é perceptível nas figuras 4.7-A, 4.7-B e 4.7-C, as membranas desenvolveram uma cor acastanhada e escura que, não só é desvantajosa para a aplicação pretendida, como também pode apontar para uma leve degradação do polímero ou para a presença de alguma impureza. Esta coloração pode estar relacionada com a rampa de aquecimento (aquecimento mais/menos rápido), com a temperatura máxima e com o tempo de duração do estágio à temperatura máxima escolhidos.

Das três membranas da figura 4.7, a tentativa da figura 4.7-A foi o resultado mais robusto. Contudo a incorporação de sal nesta membrana aparenta ser apenas superficial, consequência direta da insuficiente fusão do P(3HB). No caso das membranas comprimidas após o protocolo de aquecimento (figuras 4.7-B e 4.7-C) notou-se uma diferença no aprisionamento de cristais de sal entre a superfície superior (onde a pressão foi aplicada) e a inferior. Foi possível ainda observar que as porosidades atingem uma maior profundidade na membrana do que na situação sem compressão.

De forma a averiguar a influência da rampa de aquecimento, do tempo de duração do estágio à temperatura máxima e da temperatura máxima na fusão e coloração do P(3HB), experimentaram-se os seguintes protocolos térmicos:

(1) aquecimento desde a temperatura ambiente até aos 220 °C, ao longo de 40 minutos (4,9 °C.min⁻¹), e exposição à temperatura máxima durante 30 minutos, perfazendo um total igual a 1 hora e 10 minutos (figuras 4.8-A e 4.8-B);

CAPÍTULO 4: APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

(2) aquecimento desde a temperatura ambiente até aos 210 °C, ao longo de 20 minutos ($9,3\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) e exposição à temperatura máxima durante 50 minutos, num total de 1 hora e 10 minutos (4.8-C);

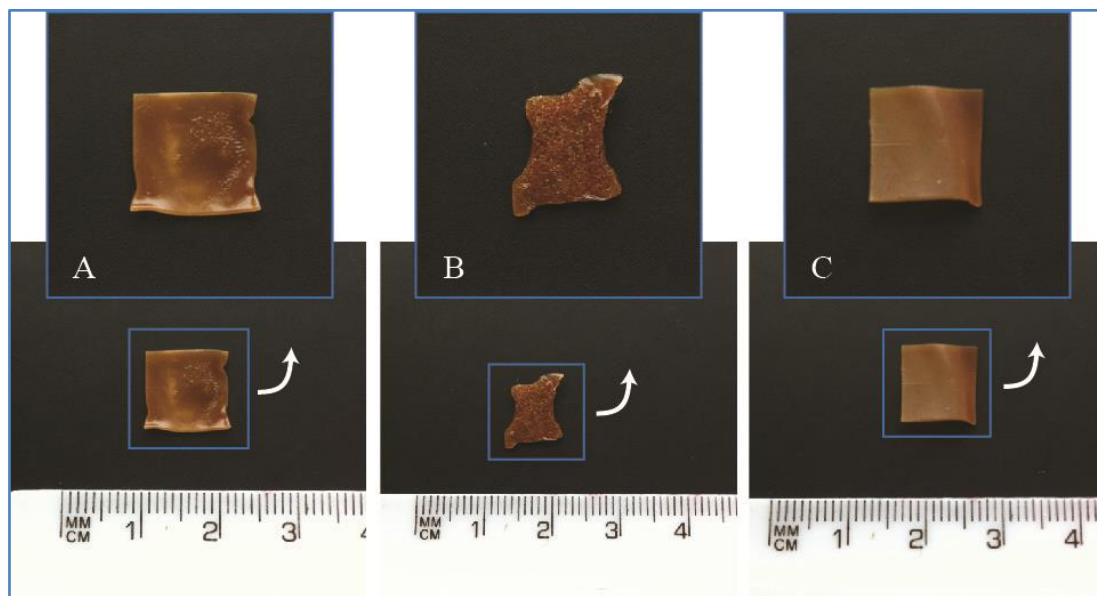


Figura 4.8 – (A) Membrana produzida por lixiviação com sal através da fusão em forno de P(3HB) misturado com NaCl ($m_{\text{polímero}}=0,05\text{ g}$, $m_{\text{sal}}=0,05\text{ g}$); (B) Membrana produzida por lixiviação com sal através da fusão em forno de P(3HB) sobre cristais de NaCl ($m_{\text{polímero}}=0,05\text{ g}$, $m_{\text{sal}}=0,05\text{ g}$); (C) Membrana produzida por lixiviação com sal através da fusão em forno de P(3HB) misturado com NaCl ($m_{\text{polímero}}=0,04\text{ g}$, $m_{\text{sal}}=0,09\text{ g}$);

A membrana na figura 4.8-A foi preparada utilizando um corte de membrana de P(3HB) com dimensões de 1x1 cm e massa igual a 0,05 g, em conjunto com 0,05 g de pó de NaCl (1:1) (m/m). O P(3HB) foi colocado no fundo de um cadinho de cerâmica (10x2x1,5 cm), revestido com folha de alumínio e coberto pelos cristais de NaCl. A membrana da figura 4.8-B foi preparada com 0,05 g de P(3HB) e 0,05 g de pó de NaCl (1:1) (m/m). Neste caso o polímero foi depositado sobre a camada formada pelos cristais de NaCl. Já no caso do ensaio correspondente à figura 4.8-C utilizou-se 0,04 g de P(3HB) juntamente com 0,09 g de cristais de NaCl, numa proporção de 1:2 (polímero/NaCl) (m/m). Semelhante à membrana na figura 4.8-A, os cristais de sal foram depositados sobre o polímero.

Analisando as imagens 4.8-A e 4.8-C, concluiu-se que os resultados são muito semelhantes às tentativas anteriores. Embora a temperatura máxima utilizada seja mais elevada e o tempo de duração do estágio à temperatura máxima seja mais longo, as membranas obtidas caracterizam-se por fraca fusão e por pouca ou nenhuma incorporação de cristais de NaCl. Este resultado aponta para a inabilidade desta técnica de promover a criação de estruturas porosas. Um possível motivo é o facto dos grãos de NaCl serem demasiado leves para conseguirem quebrar a

tensão superficial do polímero fundido através apenas da ação da força gravítica. Contrastando com este resultado apresenta-se a membrana da figura 4.8-B, onde o corte de P(3HB) foi colocado em cima dos grãos de sal. Como é visível, quando comparada com as figuras 4.8-A e 4.8-C, a membrana de P(3HB) encolheu consideravelmente em área, provocando uma variação errática na sua morfologia. Este efeito deve-se, provavelmente, ao facto do polímero ter fundido e escorrido por entre os cristais de NaCl, por ação gravítica.

Quanto à coloração, é possível concluir que esta não depende da taxa de aquecimento ou do tempo de duração do estágio à temperatura máxima, visto que membranas produzidas com protocolos diferentes – aquecimento desde a temperatura ambiente até aos 220 °C (4,9 °C.min⁻¹), com 30 minutos a 220 °C para as membranas das figuras 4.8-A e 4.8-B e aquecimento desde a temperatura ambiente até aos 210 °C (9,3 °C.min⁻¹), com 50 minutos a 210°C para a membrana da figura 4.8-C) – obtiveram igualmente uma tonalidade acastanhada e escura. Este resultado enfatiza a pequena significância da taxa de aquecimento e elevada importância do tempo total de cozedura na fusão do polímero.

Como consequência do insucesso na manipulação do P(3HB) com recurso a um forno, devido à sua fraca fusão em paralelo com o desenvolvimento de uma coloração escura, olhou-se para a prensa térmica como alternativa. Ao se aplicar uma pressão, não só a energia calorífica é transferida de forma mais eficiente, mas também se contribui para a redução da temperatura de fusão do polímero. Desta forma, testou-se através desta técnica a possibilidade de derreter por completo o polímero utilizando uma temperatura inferior, procurando evitar o escurecimento da membrana.

Inicialmente, testou-se um retângulo de P(3HB) (0,05 g) sobre pó de NaCl (0,05 g), numa proporção de 1:1 (m/m). O protocolo térmico consistiu em aquecer o polímero desde a temperatura ambiente até aos 200 °C, durante 10 minutos (17,5 °C.min⁻¹), momento onde a membrana foi removida da prensa e deixada arrefecer. O resultado, representado na figura 4.9-A, mostra como o polímero envolveu uniformemente os cristais de NaCl, formando uma fina membrana porosa. É de salientar que, para este tempo de aquecimento, a membrana não escureceu, ainda que tenha desenvolvido uma ligeira tonalidade amarelada.

Com os objetivos de delimitar uma área porosa na membrana em conjunto com o de testar temperaturas máximas mais baixas fabricaram-se as membranas nas figuras 4.9-B e 4.9-C. No seu fabrico, utilizaram-se máscaras de dimensões 5x5 cm com uma abertura circular central de diâmetro igual a 0,5 cm. No caso da membrana 4.9-B, utilizaram-se 0,05 g de NaCl, colocados sobre a máscara feita a partir de polietileno naftalato (PEN). A máscara, por sua vez, encontrava-se sobre 0,04 g de P(3HB). Já no caso da membrana 4.9-C, pesaram-se 0,05 g de NaCl

CAPÍTULO 4: APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

que foram colocados sobre uma máscara de acetato a cobrir uma membrana de P(3HB) com 0,04 g.

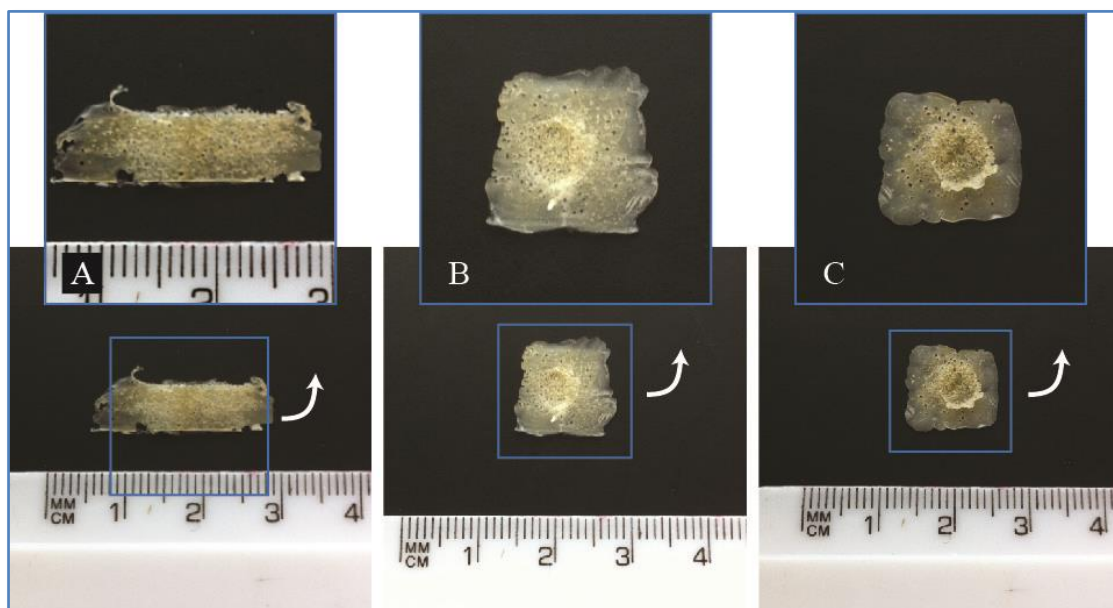


Figura 4.9 - (A) Membrana produzida por lixiviação com sal através da fusão de P(3HB) em prensa sobre NaCl ($m_{\text{polímero}}=0,05$ g, $m_{\text{sal}}=0,05$ g); (B) Membrana produzida por lixiviação com sal através da fusão de P(3HB) em prensa utilizando uma máscara de PEN e NaCl ($m_{\text{polímero}}=0,04$ g, $m_{\text{sal}}=0,05$ g); (C) Membrana produzida por lixiviação com sal através da fusão de P(3HB) em prensa utilizando uma máscara de acetato e NaCl ($m_{\text{polímero}}=0,04$ g, $m_{\text{sal}}=0,05$ g);

Em ambos os ensaios o polímero foi aquecido desde os 25 até aos 180 °C (em 5 min) e exposto à temperatura máxima durante 5 minutos. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, as membranas foram lavadas em 150 mL água destilada, por 3 sessões de 15 minutos, com recurso a banho ultrassónico. O volume de água foi renovado entre cada sessão.

Em primeira análise note-se a delimitação da área porosa. Em ambas as membranas, é notória a dispersão dos cristais de NaCl muito além da área circular central (situação intensificada na membrana da figura 4.9-B), revelando esta técnica como impróspera para o efeito pretendido. Dando foco agora à questão da coloração do polímero quando aquecido, e comparando as membranas das figuras 4.9-B e 4.9-C (180 °C) com a membrana da figura 4.9-A (200 °C), nota-se uma ligeira tendência para reduzir com a redução da temperatura. Contudo, é necessário ter em atenção que nos ensaios a 180 °C a máscara se encontrava entre o polímero e a placa de aquecimento da prensa. Tal pode, de certa forma, ter protegido o polímero da fonte de calor e evitado o desenvolvimento de um tom amarelado.

Para melhor perceber a relação entre o tom amarelado e o protocolo térmico, é importante testar para temperaturas mais baixas. Para tal, elaboraram-se as membranas das figuras 4.10-A e 4.10-B. Para a membrana 4.10-A pesaram-se 0,06 g de P(3HB) em conjunto com 0,06 g de pó de

4.3 PRODUÇÃO DE MEMBRANAS POROSAS

NaCl, sendo que a mistura foi prensada durante 5 minutos, à temperatura de 170 °C. Para a membrana da figura 4.10-B, pesaram-se 0,05 g de P(3HB) e 0,05 g de NaCl, que foram aquecidos à temperatura de 160 °C na prensa, por 5 minutos. Como é observável, a coloração pouco ou nada se alterou com a diminuição da temperatura de 170 para 160 °C.

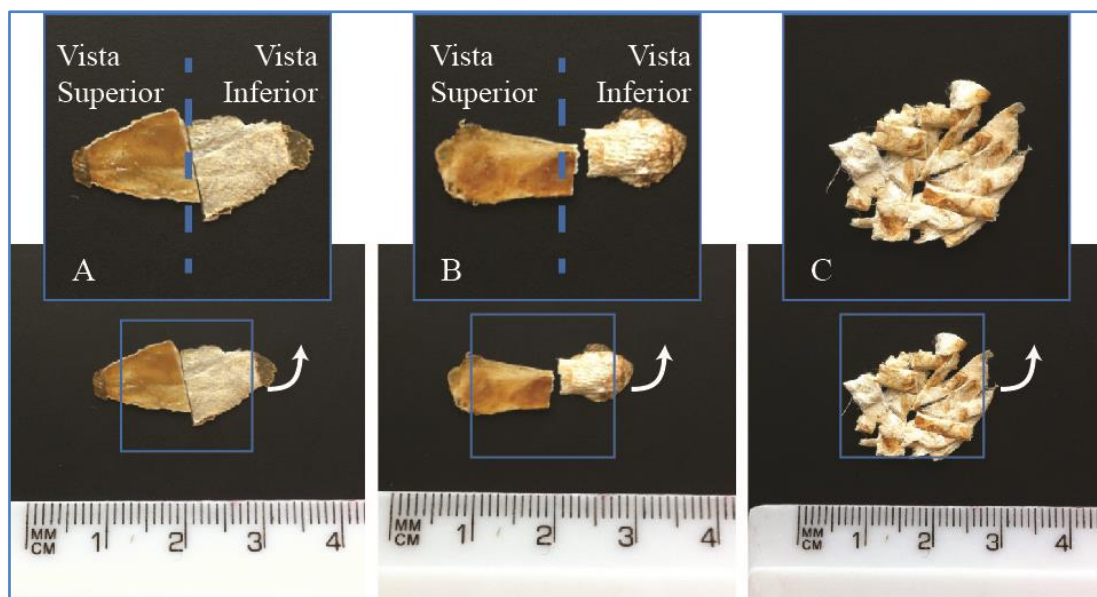


Figura 4.10 - (A) Membrana produzida por lixiviação com sal através da fusão de P(3HB) em prensa sobre NaCl ($m_{\text{polímero}}=0.06$ g, $m_{\text{sal}}=0.06$ g); (B) Membrana produzida por lixiviação com sal através da fusão de P(3HB) em prensa sobre NaCl ($m_{\text{polímero}}=0.05$ g, $m_{\text{sal}}=0.05$ g); (C) Membrana produzida por fusão de P(3HB) no forno ($m_{\text{polímero}}=0.23$ g);

Quanto à incorporação de sal, quanto menor a temperatura, menos profunda se torna a camada porosa, por motivos óbvios: o polímero não funde completamente e, desta forma, não consegue fluir por entre os grãos de sal, de modo a os envolver.

Com a suspeita de que a origem do tom acastanhado estava em impurezas no P(3HB), provavelmente substâncias oleosas, decidiu-se dissolver o polímero disponível em clorofórmio e proceder a uma precipitação em etanol frio, gota a gota, de modo a o purificar.

Utilizando o P(3HB) purificado e um cadinho de cerâmica, tentou-se então fundir o polímero no forno, durante 40 minutos a 180 °C. Após os 40 minutos, aplicou-se pressão sobre o cadinho, na tentativa de comprimir os fragmentos fundidos de P(3HB). Contudo, como é visível na figura 4.10-C, estes não se fundiram, apenas escureceram.

Com estes ensaios é possível concluir que a combinação de P(3HB) produzido a partir de uma cultura pura alimentada a OAU, com processos térmicos acima dos 160 °C, leva inevitavelmente à coloração e escurecimento da superfície do polímero. Este efeito é indesejável se se pretende desenvolver uma plataforma capaz de devolver uma leitura colorimétrica, como é o caso deste trabalho.

CAPÍTULO 4: APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Ainda dentro da lixiviação com sal, existem as técnicas que, ao invés de contarem com elevadas temperaturas, utilizam a dissolução do polímero em clorofórmio, seguida de evaporação do solvente, para a produção de membranas.

Na figura 4.11 estão representadas três membranas e seus respectivos ensaios de capilaridade, fabricadas através da mistura de cristais de NaCl na solução de polímero em clorofórmio, seguida de evaporação do solvente em *hotte* durante 48h. Uma vez secas, estas foram lavadas com água destilada em banho de ultrassons e posteriormente colocadas a secar na *hotte*. Por fim, realizaram-se os testes de capilaridade com corante alimentar verde, numa diluição de 50:50 (v/v) com água destilada, no sentido de perceber a eficácia deste método na produção de membranas microfluídicas.

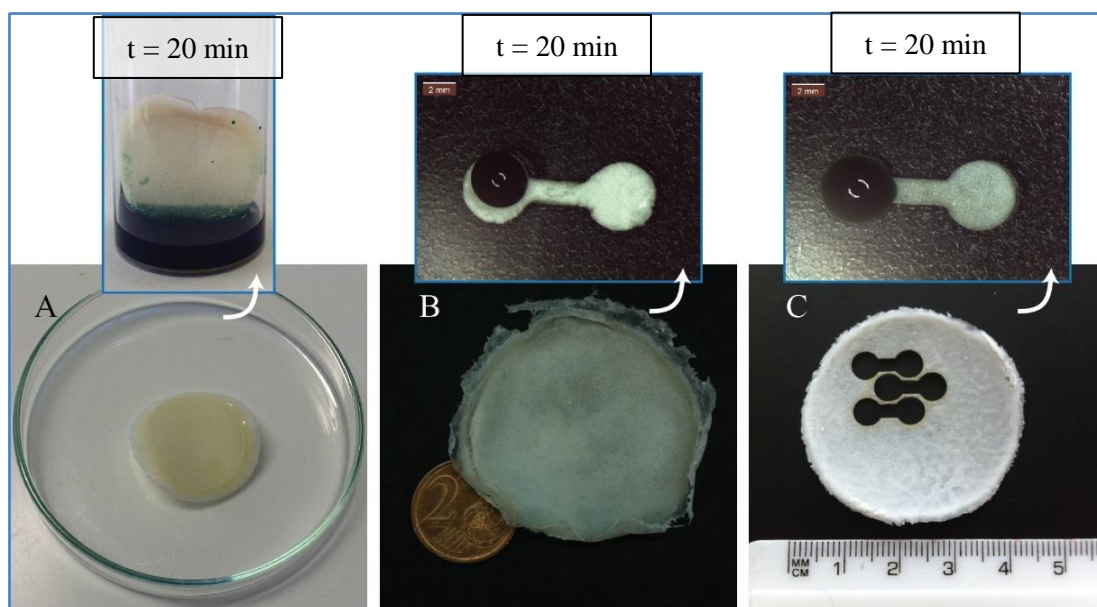


Figura 4.11 - Membranas produzidas através da mistura de sal na solução de polímero em clorofórmio (em baixo) e respectivos testes de capilaridade, no instante $t=20$ min (em cima): (A) membrana de P(3HB) obtido a partir de OAU ($m_{\text{polímero}}=0.50$ g, $m_{\text{sal}}=0.51$ g, $V_{\text{clorofórmio}}=10$ mL); (B) Membrana de P(3HB-co-HV) obtido a partir de polpa de maçã residual ($m_{\text{polímero}}=0.21$ g, $m_{\text{sal}}=0.21$ g, $V_{\text{clorofórmio}}=10$ mL); (C) membrana de P(3HB) Biomer ($m_{\text{polímero}}=0.30$ g, $m_{\text{sal}}=0.31$ g, $V_{\text{clorofórmio}}=10$ mL);

Como é evidente pelas imagens da figura 4.11, o corante não se consegue movimentar ao longo das membranas. Para uma razão entre polímero e NaCl de 1:1 (m/m), estas películas são porosas, quando observadas a olho nu. Contudo, esta porosidade não possui as qualidades (tamanho de poros, conectividade entre poros, molhabilidade da própria superfície polimérica) necessárias para desenvolver fenómenos de microfluídica.

Desta forma, desenvolveram-se membranas utilizando P(3HB) obtido a partir de OAU e aumentando proporcionalmente a quantidade de NaCl. Na figura 4.12 observam-se, por ordem, membranas com razões de 2:3, 1:3 e 1:10 entre P(3HB) e NaCl (m/m) e os respectivos testes de capilaridade. Para a produção da membrana da figura 4.12-A, utilizou-se 0,50 g de P(3HB) e 0,76

4.3 PRODUÇÃO DE MEMBRANAS POROSAS

g de NaCl em 10 mL de clorofórmio. No caso da membrana 4.12-B, utilizou-se 0,29 g de P(3HB) e 0,92 g de NaCl em 10 mL de clorofórmio. Por fim, para a membrana da figura 4.12-C, utilizou-se 0,15 g de P(3HB) e 1,51 g de NaCl, em 10 mL de clorofórmio. As três membranas foram fabricadas segundo o método descrito anteriormente.

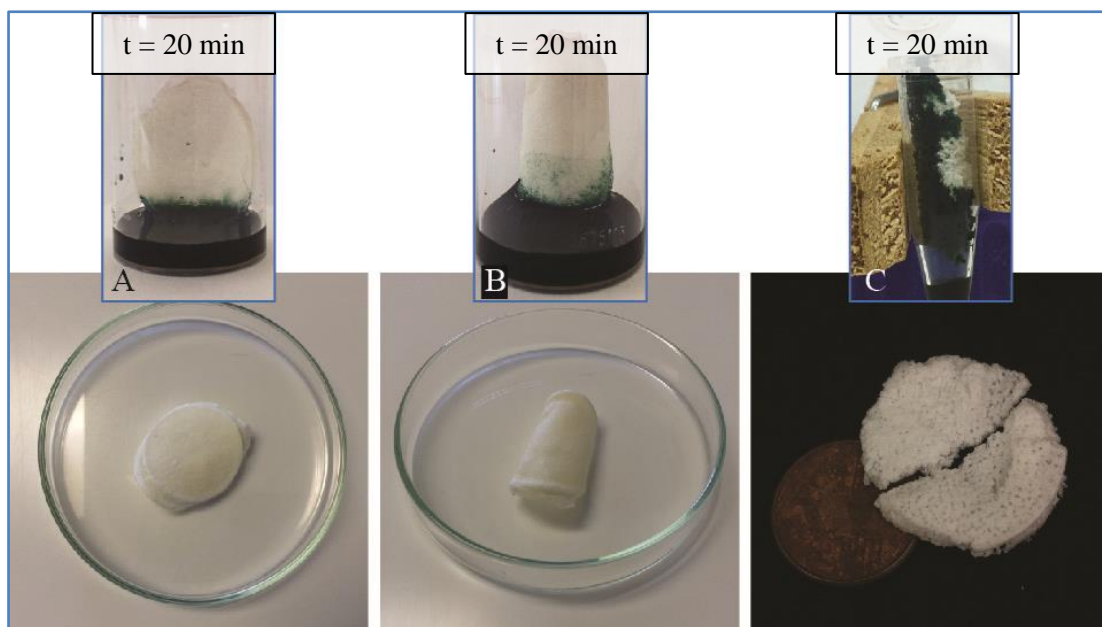


Figura 4.12 - Membranas produzidas com P(3HB) obtido a partir de OAU por lixiviação com sal através da evaporação do solvente (em baixo) e respectivos testes de capilaridade, no instante $t=20$ min (em cima): (A) $m_{\text{polímero}}=0.50$ g, $m_{\text{sal}}=0.76$ g, $V_{\text{clorofórmio}}=10$ mL; (B) $m_{\text{polímero}}=0.29$ g, $m_{\text{sal}}=0.92$ g, $V_{\text{clorofórmio}}=10$ mL; (C) $m_{\text{polímero}}=0.15$ g, $m_{\text{sal}}=1.51$ g, $V_{\text{clorofórmio}}=10$ mL);

Segundo Sun et al. [59], a porosidade das membranas é praticamente independente do tamanho dos grãos de sal, variando de forma mais significativa com a proporção entre os grãos de sal e o polímero. Para uma razão em peso entre sal e polímero igual a 9:1, é possível obter porosidades na ordem dos 85% [35]. Analisando os resultados da figura 4.12, é possível observar que, quanto maior a proporção de sal, mais porosa se torna a estrutura, devido a um aumento da conectividade entre os poros. Esta conectividade, em conjunto com poros de tamanho reduzido (centenas de nanômetros de diâmetro), torna possível a deslocação do fluido corado por efeito de capilaridade. No caso da membrana da imagem 4.12-A, este efeito foi mínimo. Na figura 4.12-B, já se observa alguma coloração da base da membrana, até aproximadamente 1/3 do seu diâmetro, para um mesmo tempo de teste. Já no caso da membrana da figura 4.12-C, o fluido corado atravessa a membrana por completo.

Embora os resultados sejam positivos para fenômenos de capilaridade, é perceptível uma evolução na morfologia e robustez das membranas. No primeiro caso, obteve-se uma membrana uniforme, plana e flexível. Já no segundo caso, a secagem resultou em uma membrana enrolada, menos maleável e mais frágil que a primeira. A fragilidade atinge o seu máximo na terceira

CAPÍTULO 4: APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

membrana, onde a massa de NaCl é 10 vezes superior à massa de P(3HB). Este rácio origina uma estrutura frágil e quebradiça que se desfaz muito facilmente. É necessário, então, encontrar uma proporção mínima suficiente de NaCl capaz de produzir membranas porosas e microfluídicas preservando simultaneamente as propriedades mecânicas do polímero, isto é, sem o fragilizar. É ainda observável que, quanto maior foi a proporção de NaCl utilizada, mais errática se tornou a forma final da membrana.

De forma geral, utilizando a evaporação de solvente na fabricação de membranas por lixiviação de sal, é muito difícil produzir tanto geometrias bem definidas, como dimensionar o produto final de forma previsível, graças ao encolhimento do polímero durante a secagem. Esta conclusão, para além de se verificar em outros trabalhos desenvolvidos na área [37], foi corroborada com as tentativas de produção de membranas em moldes tridimensionais.

Utilizaram-se três moldes para este propósito: (1) o primeiro em forma de paralelepípedo, de dimensões 3,2x1,7x0,8 cm e fundo liso, com o canal de deteção em relevo na tampa, com 1 mm de profundidade (figura 4.13-A); (2) uma caixa em forma de paralelepípedo de dimensões 3,2x1,7x0,8 cm, com o canal de deteção no fundo, delineado por uma muralha fina (0,2 mm), e com tampa lisa (figura 4.13-B); (3) um recipiente retangular, de fundo liso, de dimensões 4,0x1,0x0,4, em conjunto com o molde em relevo de dois canais com 0,5 cm de altura (figura 4.13-C). Através do *software* de desenho assistido por computador (CAD, do inglês *Computer-Aided Design*) *Fusion360*, Autodesk (EUA), dimensionaram-se as estruturas para impressão.

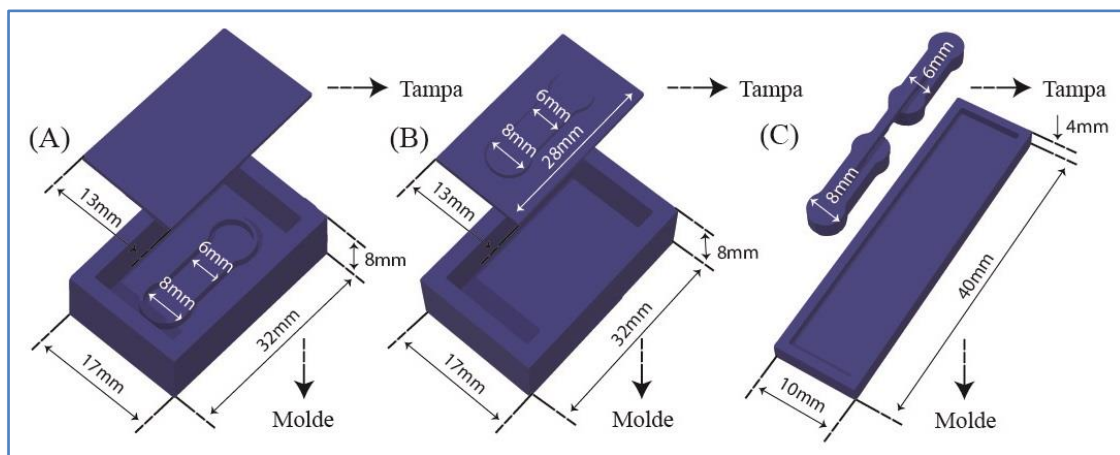


Figura 4.13 - Dimensionamento dos moldes tridimensionais criados através do software de desenho assistido por computador Fusion360, Autodesk (EUA);

Os moldes foram fabricados a partir de uma resina para altas temperaturas (*High Temp Resin*, da *formlabs*) resistente a clorofórmio, e são visíveis na figura 4.14.

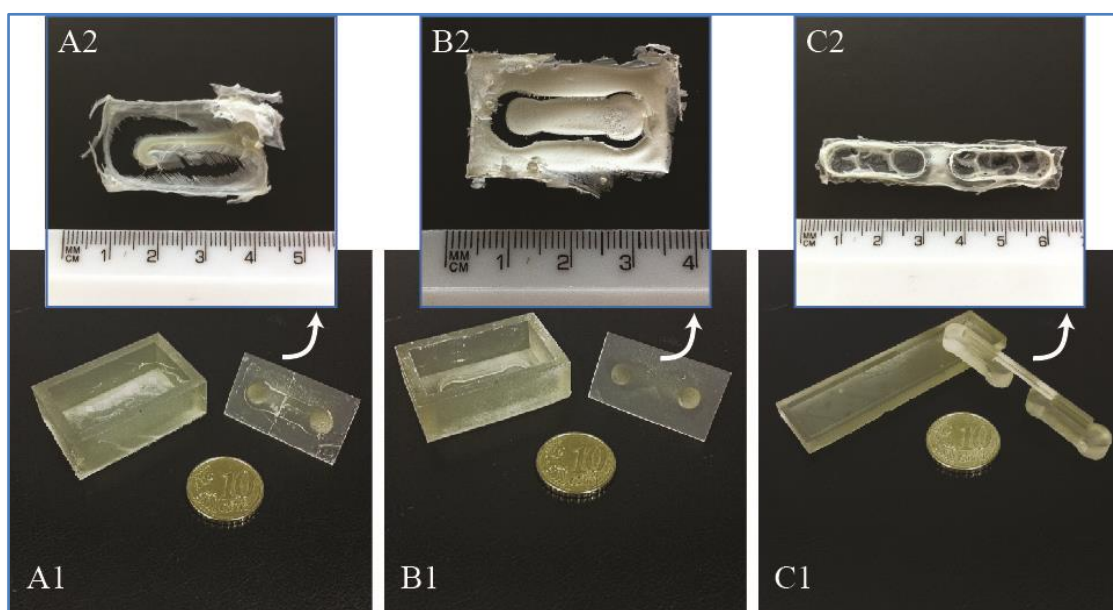


Figura 4.14 - Moldes tridimensionais produzidos a partir de resina para altas temperaturas, com a impressora 3D Form 2, comercializadas pela formlabs (EUA) (em baixo); Resultado da produção de membranas por evaporação de solvente em moldes tridimensionais (em cima)

As membranas produzidas com recurso aos moldes tridimensionais deram uso a 2 mL de solução de P(3HB) obtido através de OAU em clorofórmio (0,055 g/mL). Como é possível observar nas figuras 4.14-A2 e 4.14-B2, as membranas secaram de forma irregular, e formaram películas não uniformes de espessura heterogênea, com pouca ou nenhuma definição de canais.

O tempo de secagem foi especialmente longo para o volume de clorofórmio utilizado (72h). Tal deve-se, em parte, à utilização de uma tampa fechada nos moldes, dificultando a evaporação do solvente. A utilização da tampa visou a uniformização da espessura da membrana. Contudo, a secagem errática do polímero fez com que se criassem bolhas de ar entre o molde e a tampa. Com o objetivo de facilitar, então, a evaporação do clorofórmio, criou-se o molde da 4.14-C1. Neste, ao invés de uma tampa fechada, utilizou-se um molde em relevo do canal de detecção, colocado sobre a solução de polímero em clorofórmio, durante a secagem. Como é observável na 4.14-C2, o resultado não foi satisfatório. Ao invés do resultado esperado, que consistia em uma membrana com duas espessuras distintas – menor na zona sob o molde dos canais de detecção e uma maior na zona circundante –, obteve-se antes uma membrana de espessura inconstante sem definição nos canais de detecção.

4.3.1.1 MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO

De modo a caracterizar morfológicamente as membranas produzidas por lixiviação com sal, observou-se as mesmas com recurso a um microscópio eletrónico. As imagens obtidas por SEM encontram-se representadas na figura 4.15.

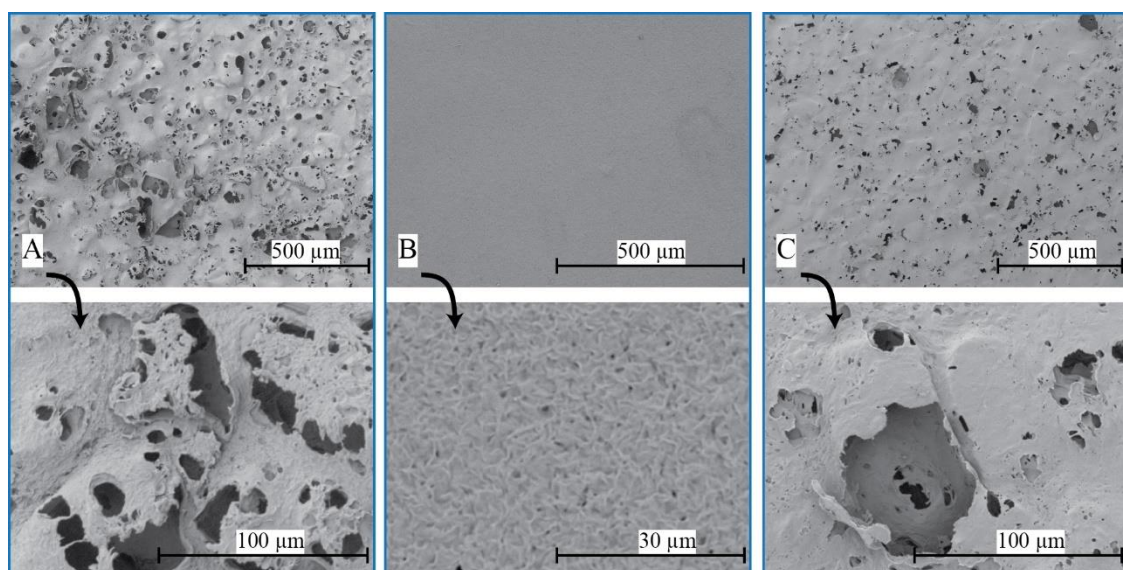


Figura 4.15 - Imagem de SEM das membranas produzidas por lixiviação com sal (polímero/NaCl=50/50) (m/m) através da evaporação do solvente: (A) P(3HB) obtido a partir de OAU; (B) P(3HB) Biomer; (C) P(3HB-co-HV) obtido a partir de polpa de maçã residual;

Observando estas imagens, verificou-se que existe uma elevada similaridade entre os dois polímeros extraídos experimentalmente (figuras 4.15-A e 4.15-C). As estruturas deixadas para trás pelos grãos de NaCl são muito semelhantes a nível morfológico nos dois casos. Já na situação do polímero comercial (figura 4.15-B), a sua superfície, embora com irregularidades na ordem dos nanómetros, não apresenta os espaços e poros observáveis nas restantes membranas.

A inconsistência nestes resultados pode dever-se à visualização em SEM de versos opostos das membranas, que podem apresentar diferenças morfológicas. Por outras palavras, é possível que as figuras 4.15-A e 4.15-C correspondam às imagens de SEM dos versos superiores das membranas respetivas, enquanto que a 4.15-B corresponda à imagem de SEM do verso em contacto com a placa de Petri (inferior) da membrana.

4.3.2 Emulsão de Água em Clorofórmio

Uma abordagem interessante ao problema da fabricação de estruturas tridimensionais porosas é a criação de emulsões. Através desta abordagem, é possível criar de forma controlada matrizes porosas com diversas aplicações avançadas, tais como servir de substrato para proliferação celular, de suporte para catalisadores, de armazenamento de gases e como membranas para purificação de água [60].

A literatura é extensa quanto ao uso desta técnica [59]–[62], recorrendo-se contudo à utilização de emulsionantes, técnicas de polimerização ou reagentes de custo elevado. Tentando cumprir a promessa de baixo custo da presente investigação, procurou-se então simplificar esta técnica e experimentar a criação de uma estrutura polimérica porosa através da secagem em *hotte* de uma emulsão de água (fase dispersa) em solução de polímero em clorofórmio (fase contínua).

4.3 PRODUÇÃO DE MEMBRANAS POROSAS

Seguindo esta técnica criaram-se 3 emulsões distintas, testando os 3 biopolímeros sob investigação dissolvidos em 10 mL de clorofórmio, em banho de óleo a 70 °C. Uma vez completamente dissolvidos (mínimo 12h), foi adicionado 1 mL de água destilada. A mistura foi agitada de forma vigorosa (1000 rpm) com recurso a um agitador magnético e uma placa de aquecimento com agitação. Na membrana da figura 4.16-A, utilizou-se 0,29 g de P(3HB) produzido a partir de OAU. Na membrana 4.16-B, utilizou-se 0,30 g de P(3HB) Biomer. E, por fim, a membrana da figura 4.16-C deu uso a 0,23 g de P(3HB-*co*-HV), obtido a partir de polpa de maçã residual.

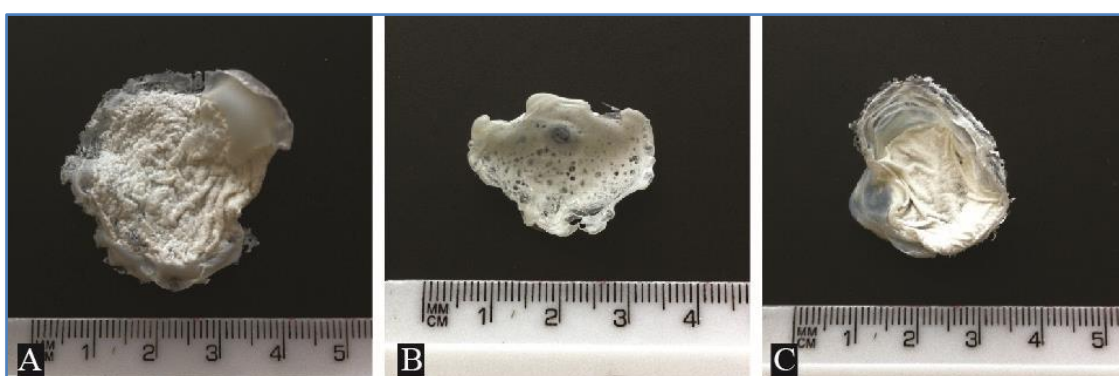


Figura 4.16 - Membranas fabricadas através da evaporação do solvente de uma emulsão de água (fase dispersa) em solução de polímero em clorofórmio (fase contínua): (A) P(3HB) obtido a partir de OAU ($m_{\text{polímero}}=0.29$ g, $V_{\text{clorofórmio}}=10$ mL, $V_{\text{água}}=1$ mL); (B) P(3HB) Biomer ($m_{\text{polímero}}=0.30$ g, $V_{\text{clorofórmio}}=10$ mL, $V_{\text{água}}=1$ mL); (C) P(3HB-*co*-HV) obtido a partir de polpa de maçã residual ($m_{\text{polímero}}=0.23$ g, $V_{\text{clorofórmio}}=10$ mL, $V_{\text{água}}=1$ mL);

De forma a imobilizar a emulsão, evitar a fusão das gotículas e evitar a separação das duas fases, a fase aquosa e a fase clorofórmica, é necessário oferecer condições favoráveis à evaporação rápida do solvente. Colocaram-se então as três misturas em copos de vidro de 150 mL e de fundo liso, cobertas com papel de alumínio e deixadas na *hotte* por 48h. Como é claro pelos ensaios da figura 4.16, e vindo de encontro ao já concluído anteriormente, a técnica de evaporação de solvente torna muito difícil a previsão da morfologia ou dimensões finais da membrana, devido ao encolhimento aleatório do polímero.

Tentando contornar esta dificuldade, tentou-se obter uma evaporação de clorofórmio mais controlada e previsível, através da secagem no interior de um exsiccador de vidro com gel de sílica (figura 4.17-A), durante 72h. Desta forma cria-se no interior do exsiccador uma atmosfera rica em clorofórmio desacelerando assim o processo de evaporação nas membranas e evitando os efeitos observados na superfície das membranas da figura 4.16. Como é perceptível na figura 4.17-B1, o objetivo pretendido de fabricar um filme fino e uniforme foi alcançado com a evaporação controlada do clorofórmio. Ainda assim falta saber se esta evaporação resultou em poros de dimensões reduzidas e conectados uns com os outros. Cortou-se tiras da membrana e realizou-se

CAPÍTULO 4: APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

um teste de capilaridade com corante alimentar (figura 4.17-B2) que permitiu concluir o seguinte: a evaporação controlada de clorofórmio de uma emulsão possibilita a criação de membranas lisas e uniformes (com alguma imprevisibilidade no seu dimensionamento). Porém, a pequena taxa de evaporação permite a fusão de parte das gotículas dispersas, levando à redução do número de poros e ao aumento da densidade da membrana. Como resultado obteve-se uma tira polimérica capaz de transportar a água corada na sua matriz. Contudo, esse transporte revelou-se demasiado lento para a aplicação final pretendida, que consiste na criação de um biossensor para a deteção de glucose em solução aquosa.

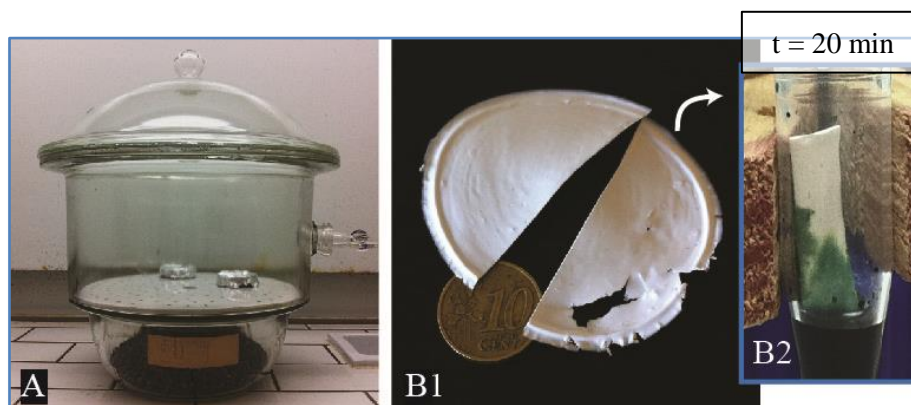


Figura 4.17 - (A) Exsicador de vidro com gel de sílica utilizado na produção de membranas poliméricas; (B1) membrana produzida através de uma emulsão de água em clorofórmio e evaporação de solvente em exsicador; (B2) teste de capilaridade numa tira da membrana B1;

É relevante acrescentar que a cor branca opaca característica das membranas produzidas por emulsão de água em solução de polímero e clorofórmio, é resultado da difração da luz pelas inúmeras interfaces água-clorofórmio criadas pelas minúsculas gotas de água dispersas na emulsão. Este resultado, embora não previsto, é de grande relevância para a aplicação em questão, melhorando significativamente o contraste entre a variação colorimétrica dos indicadores e o substrato onde é feita a leitura.

Para concluir, a técnica de produção de estruturas porosas através de emulsões pode ser potencialmente utilizada para criação de plataformas microfluídica para testes colorimétricos. Não obstante, e tendo em conta a extensão desta investigação, o desenvolvimento deste método não foi continuado.

4.3.2.1 MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO

A partir da comparação entre as superfícies das membranas obtidas com diferentes taxas de evaporação de solvente, verifica-se uma diferença óbvia na rugosidade e distribuição de poros. A membrana da figura 4.18-A, com secagem em *hotte* durante 48h, apresenta uma superfície muito mais irregular, e uma maior variabilidade no tamanho dos poros na sua superfície. Já a membrana da figura 4.18-B, com secagem num exsicador durante 72h, possui uma superfície lisa,

com uma distribuição de poros menos densa e homogênea, e uma distribuição de tamanho dos poros muito bem definida, quando comparada com a membrana da figura 4.18-A.

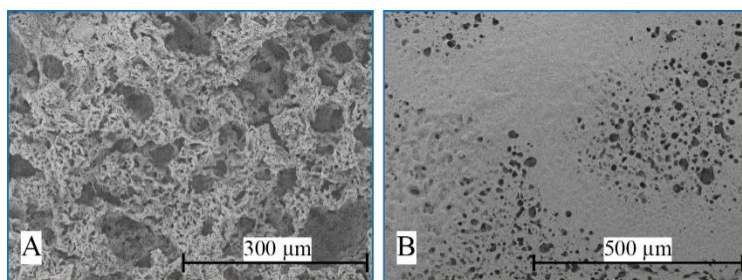


Figura 4.18 - Imagens de SEM da superfície das membranas produzidas por evaporação de solvente de emulsões de água em solução de P(3HB) obtido a partir de OUA em clorofórmio: (A) evaporação rápida em *hotte* (48h); (B) evaporação lenta em exsiccador de vidro (72h);

Estas imagens estão de acordo com as imagens das figuras 4.16 e 4.17-B1, onde se verifica que, para uma evaporação de solvente mais rápida, a membrana torna-se irregular mas rica em poros, e que, para uma evaporação de solvente mais lenta, a membrana torna-se lisa e uniforme, contudo menos porosa.

4.3.3 Tratamento com UV/O₃

A degradação de um material pode ocorrer por meio de diversos agentes como a luz, a temperatura, a humidade relativa ou radiações. No caso do tratamento com UV/O₃ esta degradação consiste na criação de espécies reativas de oxigénio (oxigénio atómico), que serão responsáveis por cisões de ligações moleculares na cadeia polimérica. Estas, a nível macroscópico, resultam em micro rugosidades e na alteração das propriedades físicas e químicas da superfície de um determinado material.

Seguindo o trabalho desenvolvido na mesma área utilizando papel impregnado com P(3HB) [63], testou-se a viabilidade deste tratamento na criação de canais poliméricos adsorventes. Seguindo a literatura, submeteram-se membranas produzidas por evaporação de solvente a partir dos diferentes biopolímeros em estudo a 120 minutos de exposição a radiação ultravioleta e ozono. A geometria pretendida para o canal foi obtida pela utilização de uma máscara de fita adesiva de kapton com o canal cortado a laser. Desta forma, e porque a máscara de kapton é opaca para radiação ultravioleta, a superfície da membrana sob a máscara permanece intacta, enquanto que a superfície exposta fica sujeita à radiação UV e à reação com as espécies reativas de O₂.

Os resultados dos testes de capilaridade para as membranas compostas de P(3HB) obtido a partir de OAU, P(3HB) da Biomer e P(3HB-co-HV) obtido a partir de polpa de maçã residual encontram-se nas figuras 4.19-A, 4.19-B e 4.19-C, respetivamente.

CAPÍTULO 4: APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Analisando as três membranas quanto à variação da posição do fluido corado entre a imagem obtida no instante inicial (figuras 4.19-A1, 4.19-B1 e 4.19-C1) e a imagem obtida passados 20 minutos (figuras 4.19-A2, 4.19-B2 e 4.19-C2) conclui-se que a degradação promovida pela exposição ao tratamento com UV/O₃ não é suficiente para criar canais microfluídicos. Ainda assim, é perceptível uma diferença substancial entre a molhabilidade da superfície exposta e a superfície coberta com a máscara de kapton, o que leva à retenção do fluido sobre a área degradada. Porém, esta melhoria na molhabilidade não consegue produzir os efeitos de capilaridade pretendidos para movimentar o fluido desde uma circunferência até à seguinte, através do canal de condução.

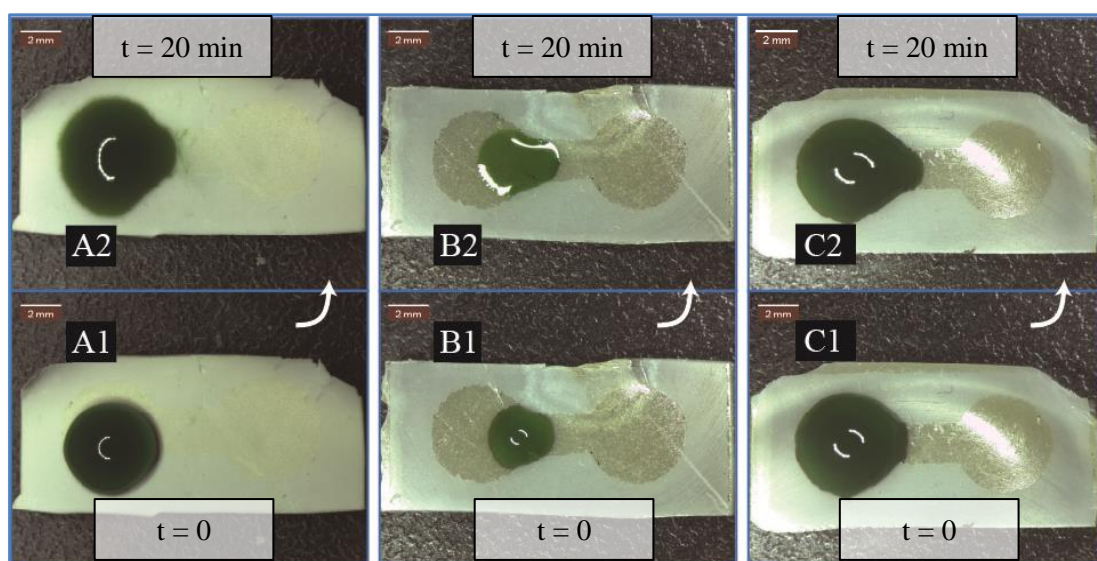


Figura 4.19 - Fotografias do teste de capilaridade com corante alimentar a membranas expostas a 120 min de tratamento UV/O₃ no instante inicial (em baixo) e passados 20 min (em cima): (A) membrana de P(3HB) obtido a partir de OAU; (B) membrana P(3HB) Biomer; (C) membrana de P(3HB-co-HV) obtido a partir de polpa de maçã residual;

4.3.3.1 MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO

Analisando as imagens obtidas a partir de SEM das membranas expostas a tratamento UV/O₃ é possível averiguar a extensão das alterações na superfície polimérica. Quando é feita a comparação entre as imagens da figura 4.20 com as imagens da figura 4.6, onde a superfície das membranas não foi submetida ao tratamento em questão, verifica-se um aumento no número de irregularidades e poros.

Nota-se ainda uma diferença considerável entre o P(3HB) obtido a partir de OAU (figura 4.20-A) e o P(3HB) comercial Biomer (figura 4.20-B). O tamanho das irregularidades formadas no primeiro é várias ordens de grandeza superior ao tamanho das irregularidades no segundo. No caso da membrana de P(3HB-co-HV), observou-se, em algumas regiões, a recessão da membrana, formando as estruturas visíveis na figura 4.20-C.

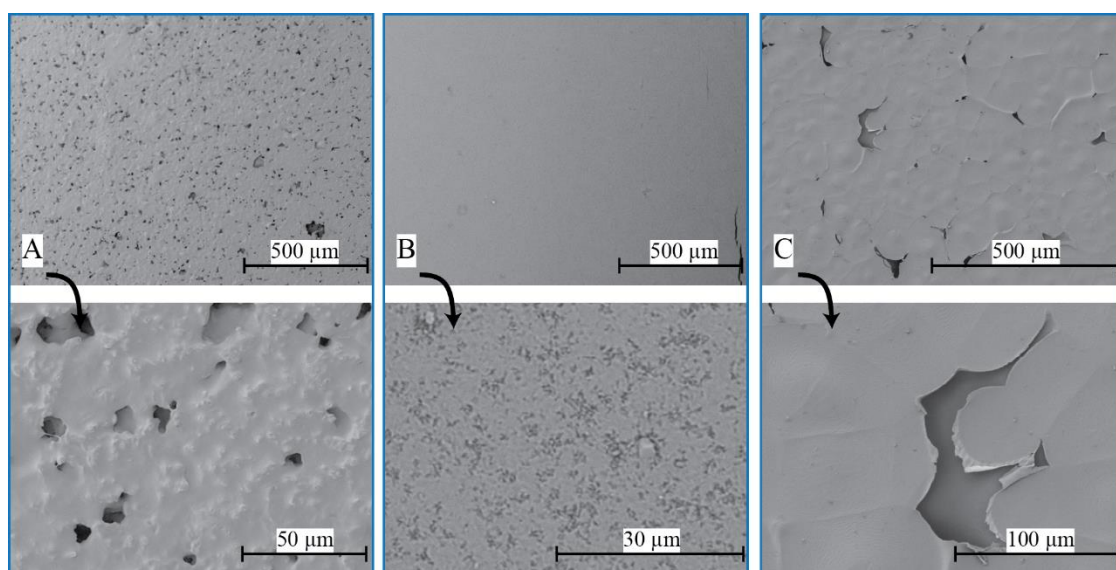


Figura 4.20 - Imagem de SEM das membranas obtidas por evaporação do solvente submetidas a 120 min de tratamento UV/O₃: (A) P(3HB) obtido a partir de OAU; (B) P(3HB) Biomer; (C) P(3HB-co-HV) obtido a partir de polpa de maçã residual;

4.3.4 Tratamento com Plasma de O₂

Ao aplicar continuamente energia à matéria, a temperatura aumenta até ocorrer uma transição do estado sólido para o líquido e, por sua vez, para o gasoso. Continuando a aplicar energia, os átomos/moléculas quebram-se em partículas eletricamente carregadas e fragmentos excitados (elétrons carregados negativamente e íons carregados positivamente). A esta mistura, o 4º estado da matéria, dá-se o nome de plasma [64]. É encontrado na natureza em relâmpagos, chamas, nas auroras boreais e no sol.

A ionização começa com a colisão de um elétron com uma molécula do gás escolhido. Nesta colisão, é libertado um novo elétron que acelera em direção ao eletrodo positivo, colidindo com outras moléculas no trajeto. A molécula positivamente carregada, por sua vez, acelera em direção ao eletrodo negativo, onde são libertados ainda mais elétrons. Estas colisões acontecem continuamente numa avalanche de elétrons e fragmentos ionizados que se mantêm estável enquanto houver fonte de energia [65].

Um equipamento de tratamento com plasma é composto por três partes: a câmara de vácuo, a bomba de vácuo e o gerador de alta frequência. O processo de tratamento com plasma é também composto por três partes: (1) evacuação da câmara e criação de uma atmosfera de baixa pressão (aproximadamente 0,1mbar), (2) admissão do gás, neste caso, oxigénio (O₂) e aplicação de uma fonte alternada de alta tensão de forma a ionizar o gás, produzindo o plasma e, por fim, (3) ventilação da câmara e remoção do material sob tratamento.

CAPÍTULO 4: APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Através desta técnica é então possível “micro-bombardear” superfícies poliméricas e criar rugosidades na ordem dos micrómetros através da quebra de ligações químicas entre carbonos. Desta forma, altera-se as propriedades da superfície aumentando, por exemplo, a sua molhabilidade. Semelhante ao tratamento com UV/O₃, esta técnica não é capaz de criar estruturas porosas nas membranas poliméricas, apenas modificar a sua superfície.

Semelhante à técnica anterior, o tratamento com plasma de oxigénio é um método muito usado para a remoção de impurezas de superfícies. Aqui, o plasma gerado a baixas pressões de O₂ produz iões altamente reativos que, por sua vez, reagem com espécies orgânicas presentes na superfície exposta, formando resíduos voláteis. Este plasma contém também energias cinéticas significativas, pelo que a colisão dos iões reativos com a superfície do material pode ter um efeito decapante. Pretende-se, então, dar uso a esse efeito, no sentido de tornar a membrana polimérica hidrofílica.

Testaram-se várias durações de exposição ao tratamento, com membranas de P(3HB) produzido a partir de OAU. Utilizaram-se máscaras de kapton nas membranas de modo a apenas expor ao plasma a área do canal de deteção. Comparando os resultados presentes na figura 4.21 para os diferentes tempos de exposição a plasma de oxigénio, é possível compreender a extensão da degradação da superfície do P(3HB) e a sua variação em função do tempo de exposição.

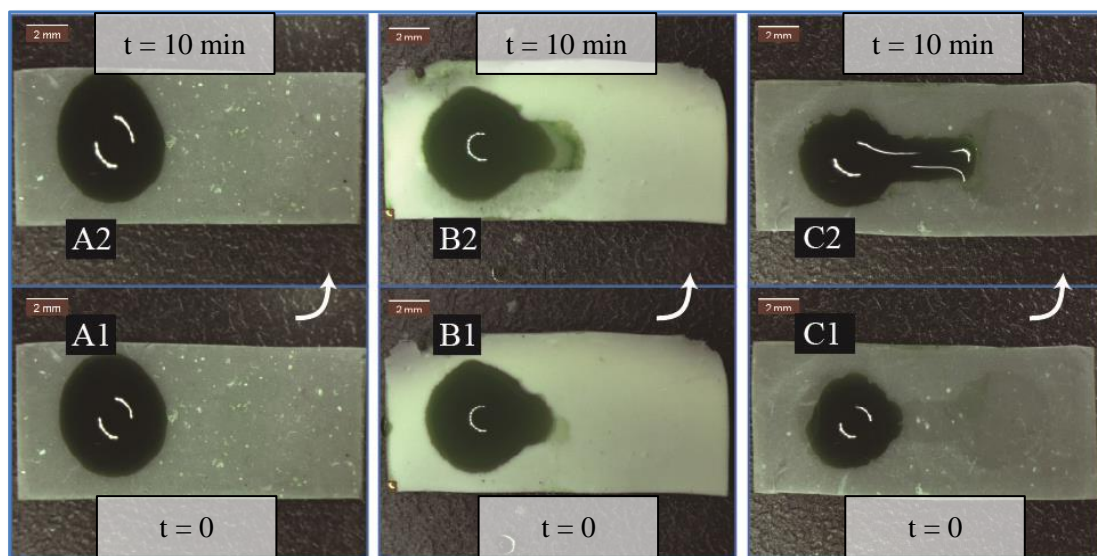


Figura 4.21 – Fotografias do teste de capilaridade com corante alimentar a membranas de P(3HB) obtido a partir de OAU e expostas a tratamento com plasma de O₂, no instante inicial (em baixo) e passados 10 min (em cima): (A) 7 min de exposição ao plasma; (B) 10 min de exposição ao plasma; (C) 13 min de exposição ao plasma;

Em primeiro lugar testou-se a membrana submetida a 7 minutos de tratamento, à qual correspondem as imagens da figura 4.21-A1 (registada no instante inicial do teste de capilaridade) e 4.21-A2 (registada passados 10 minutos). É perceptível que o tempo de exposição de 7 minutos não foi suficiente para promover o desenvolvimento de fenómenos microfluídicos. Relativamente

à molhabilidade da superfície exposta, em comparação com a superfície sob a máscara de kapton, não se verifica uma diferença significativa, visível na forma como a gota de água corada se espalha pela membrana, não respeitando a morfologia do canal.

Em segundo lugar, testou-se o ensaio com tratamento de duração igual a 10 minutos, cujo resultado se encontra nas figuras 4.21-B1 e 4.21-B2. É visível que, após 10 minutos de teste de capilaridade, uma camada fina e superficial de fluido corado conseguiu deslocar-se aproximadamente 2 mm no canal de deteção.

Já no terceiro caso, com exposição a plasma por 13 minutos (figuras 4.21-C1 e 4.21-C2), observam-se melhorias na capacidade de a membrana transportar o líquido desde uma área circular à seguinte, contudo este transporte acontece de forma demasiado lenta (>10 minutos). Desta forma, e tendo em conta as propriedades necessárias para a criação de um dispositivo de diagnóstico rápido, torna-se inválida a utilização desta técnica em membranas de P(3HB), durante os tempos de exposição testados.

Observando o melhoramento entre a molhabilidade da membrana exposta em contraste com a membrana não exposta, suspeitou-se que o mau desempenho das membranas porosas da figura 4.11, produzidas por lixiviação com sal, estivesse relacionado com o simples facto de o fluido corado (água destilada e corante alimentar, 1:1 (v/v)) não molhar a superfície polimérica, visto esta ser hidrófoba. Seguindo este raciocínio, experimentou-se realizar um tratamento em canais cortados a laser a partir de uma membrana produzida por lixiviação com sal (polímero/NaCl=50/50) (m/m) e evaporação de solvente, na previsão de que o oxigénio preenchesse todo o espaço poroso na matriz da membrana e, uma vez formado o plasma, toda a sua superfície interna fosse bombardeada e subsequentemente modificada. Confirmando o previsto, encontram-se na figura 4.22 os resultados do teste de capilaridade aos canais expostos a diferentes tempos de tratamento.

Para o tratamento com duração de 13 minutos, a gota de fluido corado a espalhou-se quase instantaneamente pelo comprimento do canal, como é visível na fotografia da figura 4.22-A1, adquirida no instante inicial. Após 5 minutos de teste (figura 4.22-A2), nota-se que o volume de fluido que antes se encontrava à superfície foi adsorvido nos espaços vazios da estrutura porosa, preenchendo toda a profundidade do canal.

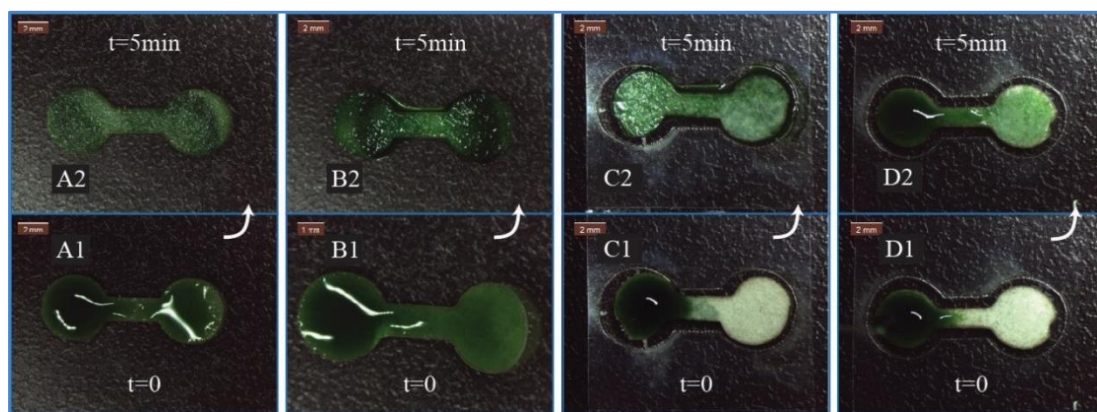


Figura 4.22 - Tratamento com plasma de O_2 em canais portados a laser a partir de uma membrana de P(3HB) Biomer produzida através de lixiviação com sal e evaporação de solvente a: (A) 13 minutos de exposição; (B) 7 minutos de exposição; (C) 5 minutos de exposição e (D) 3 minutos de exposição;

A partir do tratamento de 7 minutos, obteve-se novamente molhabilidade quase instantânea no canal imediatamente após a deposição da gota na área circular, como é perceptível pela figura 4.22-B1. Passados 5 minutos (figura 4.22-B2), de forma semelhante ao verificado na imagem da figura 4.22-A2, constata-se que o volume de líquido se distribuiu uniformemente pelo comprimento e profundidade do canal.

De modo a otimizar esta técnica, tentou-se encontrar o tempo de tratamento mínimo necessário para desenvolver fenômenos microfluídicos nos canais porosos. Testou-se então a exposição das membranas a 5 (figura 4.22-C1) e 3 minutos (figura 4.22-D1) ao plasma de O_2 . Uma diferença óbvia, quando comparadas com os tempos de exposição de 13 e 10 minutos, é a imagem capturada no instante inicial: o fluido não se espalha quase instantaneamente por todo o comprimento da membrana. Contudo, passados 5 minutos de teste de capilaridade, é possível constatar que ambos os canais possuem a capacidade de movimentar o fluido corado. No caso da membrana exposta a 5 minutos de tratamento, o canal fica completamente corado (figura 4.22-C2). Já no caso da membrana exposta a apenas 3 minutos de tratamento, embora capaz de deslocar o volume de líquido, este processo é mais lento, necessitando de um tempo de movimentação superior a 5 minutos para preencher todo o canal.

Com estes resultados conclui-se que um tempo de exposição a plasma de O_2 igual a 5 minutos é o mínimo necessário para potencializar propriedades microfluídicas com as características pretendidas para o desenvolvimento de dispositivos de fluxo lateral a partir de membranas poliméricas porosas.

4.3.4.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARRIMENTO

De modo a relacionar as superfícies e as suas características microfluídicas com a sua morfologia, observou-se por SEM as membranas expostas ao tratamento de plasma de O_2 . Através das figuras 4.23 e 4.24, é possível estabelecer uma comparação morfológica entre as membranas

4.3 PRODUÇÃO DE MEMBRANAS POROSAS

obtidas por evaporação de solvente e as membranas obtidas por lixiviação com sal e evaporação de solvente, após exposição a 10 minutos de tratamento de plasma de O₂.

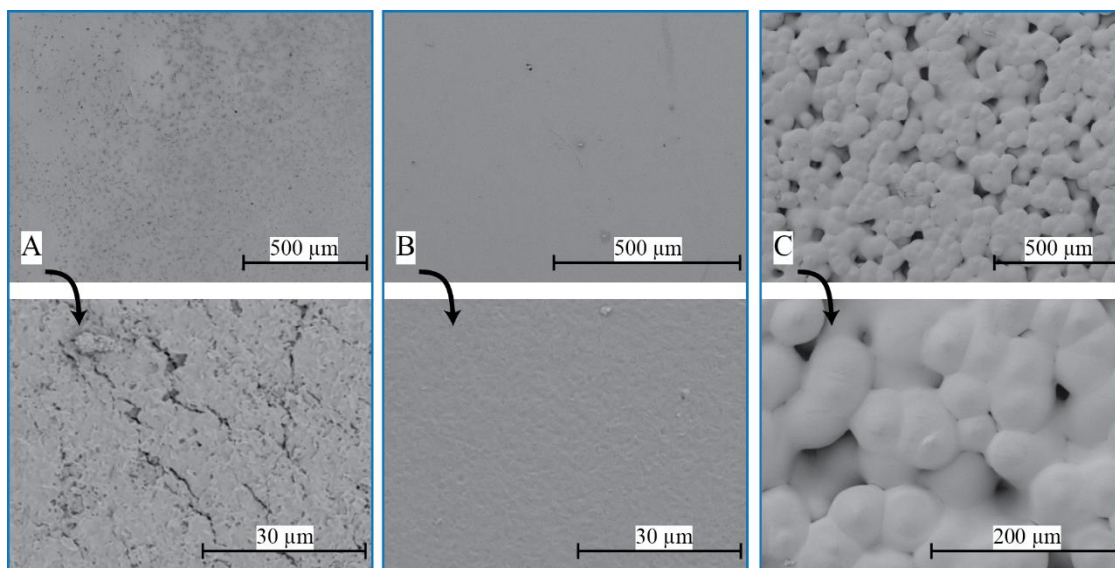


Figura 4.23 - Imagem de SEM das membranas obtidas por evaporação de solvente submetidas a 10 min de tratamento de plasma de O₂: (A) P(3HB) obtido a partir de OAU; (B) P(3HB) Biomer; (C) P(3HB-co-HV) obtido a partir de polpa de maçã residual;

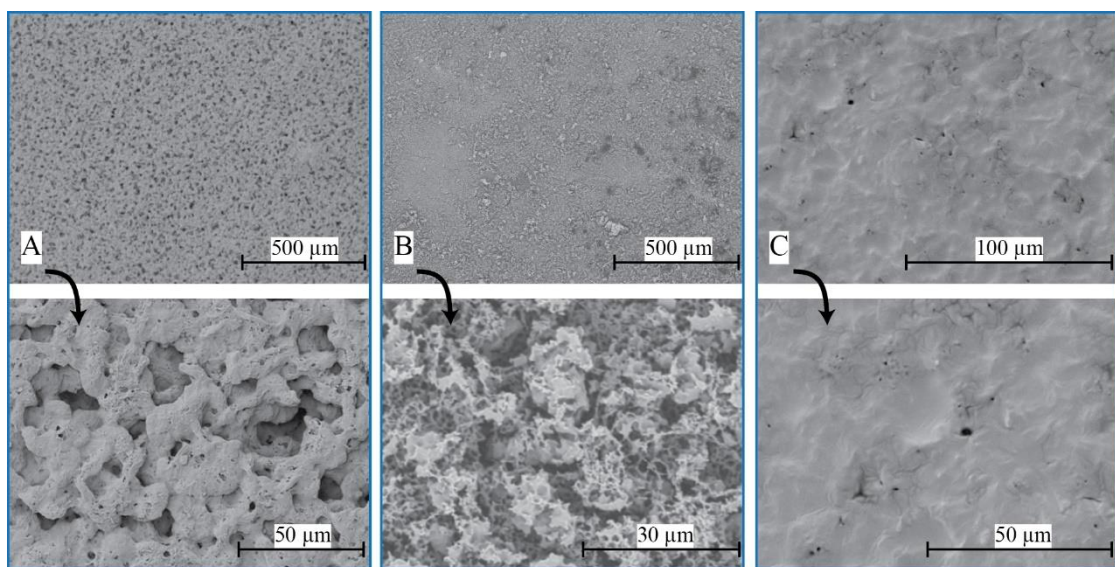


Figura 4.24 - Imagem de SEM das membranas obtidas por lixiviação com sal (polímero/NaCl=50/50) (m/m) e evaporação de solvente, submetidas a 10 min de tratamento de plasma de O₂: (A) P(3HB) obtido a partir de OAU; (B) P(3HB) Biomer; (C) P(3HB-co-HV) obtido a partir de polpa de maçã residual;

Para a membrana de P(3HB) obtido a partir de OAU sem lixiviação com sal (figura 4.23-A) verifica-se o desenvolvimento de fissuras nanométricas superficiais. Já para a membrana produzida através da lixiviação com sal (figura 4.24-A), verifica-se o desenvolvimento de poros e irregularidades de várias dimensões. Nota-se ainda que a superfície possui uma textura rugosa,

CAPÍTULO 4: APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

possivelmente relacionada com a capacidade adsorvente desenvolvida após o tratamento de plasma de O₂. No caso da membrana de P(3HB) Biomer sem lixiviação com sal (figura 4.23-B) o efeito da exposição ao plasma de O₂ resultou em um efeito mínimo, dando origem a uma superfície ligeiramente rugosa. Quanto à membrana de P(3HB) Biomer porosa, obtida por lixiviação com sal, o resultado é uma superfície extremamente rugosa e irregular, rica em poros de variadas dimensões (figura 4.24-B). Finalmente, para a membrana de P(3HB-co-HV) obtida a partir de polpa de maçã residual, sem lixiviação com sal (figura 4.23-C), verifica-se uma superfície muito semelhante à superfície do mesmo polímero antes de ser submetido ao tratamento de plasma (figura 4.6-C), com um aumento na densidade de poros. Quando se adicionou a lixiviação com sal ao procedimento, o tratamento com plasma de O₂ produziu as rugosidades observáveis na figura 4.24-C, contudo não são visíveis poros. É possível que o tempo de exposição ou a potência sejam demasiado elevados para este polímero, o que leva à fusão da sua superfície e desaparecimento das estruturas porosas superficiais.

Face aos resultados obtidos pelas técnicas de caracterização descritos acima, decidiu-se avançar com a produção de membranas adsorventes através da combinação da técnica de lixiviação com sal (polímero/NaCl=50/50) (m/m) com tratamento de plasma de O₂. O polímero escolhido foi o P(3HB) Biomer, devido à qualidade da sua superfície a nível de capilaridade, após o tratamento de plasma, quando comparado com os restantes polímeros.

4.4 Caracterização das membranas porosas

4.4.1 Porosimetria

Como forma de caracterizar as membranas mais promissoras em termos de porosidade e distribuição do diâmetro médio dos poros, utilizou-se a técnica de intrusão de mercúrio. Através de pressões controladas, o porosímetro força o mercúrio a entrar nos poros da membrana. Quando a pressão é suficiente, o mercúrio ocupa o volume de poros com um determinado tamanho, resultando no gráfico representado na figura 4.25 e nos valores de porosidade e diâmetro médio de poros na tabela 4.1.

Verificou-se, através desta técnica, que uma membrana de P(3HB) simples obtida por evaporação controlada de solvente possui uma porosidade inerente de 18.53%. Infelizmente, a análise da amostra PHB simples (figura 4.25-A) pode não ter corrido da melhor forma. Isto porque a membrana utilizada não "consumiu" um volume de mercúrio suficiente para uma análise válida, segundo os parâmetros de aceitação do equipamento (>25% volume da haste - *stem volume*), e porque apresenta uma intrusão repentina a baixa pressão. Daqui resulta um diâmetro médio de poro erráticamente elevado. Já no caso de uma membrana de P(3HB) obtida por lixiviação com sal (P(3HB)/NaCl=50/50) (m/m), o valor da porosidade medida sobe para os 47.39%, com um diâmetro médio de poros igual a 0.295 µm. Finalmente, e utilizando uma membrana idêntica à anterior em conjunto com 13 min de exposição a tratamento de plasma de O₂, obtem-se um valor de porosidade igual a 53.09%, com um diâmetro médio de poros igual a 0.332 µm.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS POROSAS

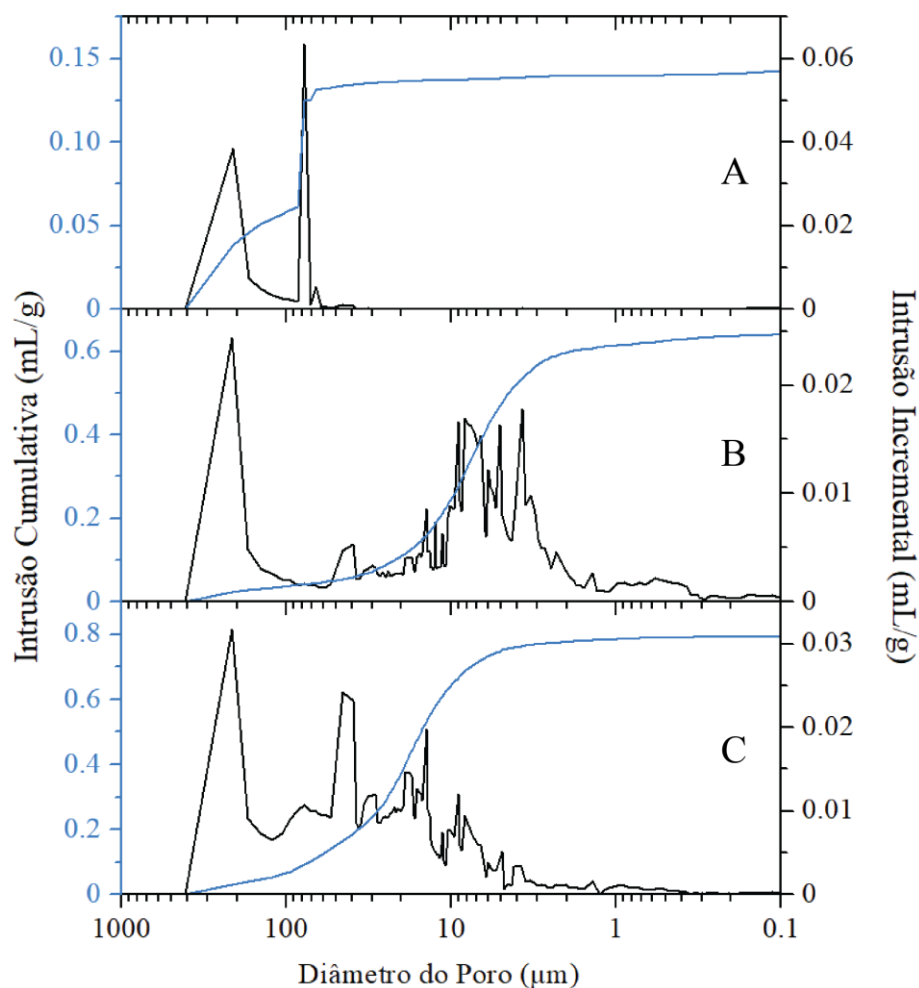


Figura 4.25 - Intrusão Cumulativa e Diferencial do mercúrio em função do diâmetro dos poros das membranas de P(3HB) Biomer. (A) membrana obtida por evaporação de solvente; (B) membrana obtida por evaporação de solvente e lixiviação com sal; (A) membrana obtida por evaporação de solvente e lixiviação com sal em conjunto com 13 min de tratamento de plasma de O_2 ;

Tabela 4.1 – Porosidade e diâmetro médio dos poros de 3 membranas de P(3HB) Biomer;

	Porosidade	Diâmetro médio dos poros
P(3HB) simples	18.53%	0.076 μm
P(3HB) lixiviado	47.39%	0.295 μm
P(3HB) lixiviado + Plasma O_2	53.09%	0.332 μm

Analisando estes resultados é possível constatar que, para um rácio entre P(3HB) e pó de NaCl igual a 50/50 (m/m), resulta uma membrana muito próxima dos 50% de porosidade. Verifica-se, também, que o tratamento de plasma de O_2 promove o aumento da porosidade da

CAPÍTULO 4: APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

membrana dos 47.39% para os 53.09%, em simultâneo com o aumento do diâmetro médio dos poros de 0.295 μm para 0.332 μm . Estes resultados estão de acordo com o teorizado sobre o efeito do tratamento de plasma de O_2 na matriz já porosa da membrana lixiviada. A degradação controlada da superfície interna dos poros deixados pelos grãos de NaCl lixiviados contribui não só para o aumento da molhabilidade da superfície, como também para o aumento ligeiro do diâmetro médio dos poros e consequentemente para o aumento da porosidade da membrana.

4.4.2 Determinação de Volume Adsorvido

De modo a minimizar custos com a produção do dispositivo de deteção, averiguou-se o volume mínimo necessário de reagentes e de amostra de teste para cada canal de deteção. Produziram-se vários canais através do corte assistido por laser de uma membrana de P(3HB) Biomer, obtida por lixiviação com sal (polímero/NaCl=50/50) (m/m) com tratamento de plasma de O_2 . Na figura 4.26 é possível observar a evolução do volume ocupado por fluido nas membranas, em função do volume de corante alimentar pipetado com uma micropipeta para uma das áreas circulares de deposição.

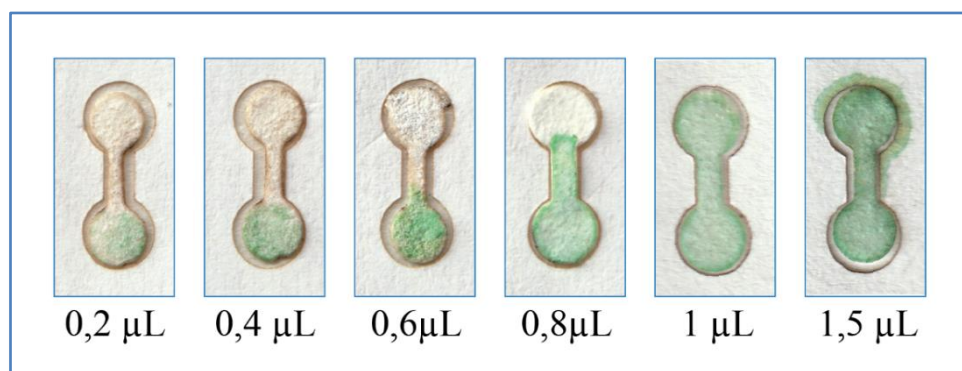


Figura 4.26 - Resultados digitalizados do teste de capacidade volumétrica dos canais de deteção;

A análise da extensão da mancha de corante permite-nos então concluir que o volume ideal para as soluções responsáveis pela deteção, confinadas à área circular de deteção, é de 0,5 μL . Assim é garantido o preenchimento de toda a área de deteção, evitando a contaminação do canal de condução. Quanto ao volume ideal para a amostra de teste, que deve ocupar o canal na sua totalidade, verifica-se que 1 μL preenche todo o comprimento da membrana sem ocorrer derrame do excesso de fluido, como no caso do ensaio com 1,5 μL .

4.5 Teste de Diagnóstico Colorimétrico

Pretende-se nesta fase utilizar os canais poliméricos adsorventes produzidos como detetores e quantificadores de glucose em soluções aquosas.

A deteção colorimétrica de glucose foi escolhida devido ao extenso estudo já desenvolvido em relação a esta técnica, permitindo assim a utilização de um sistema de deteção simples para o

4.5 TESTE DE DIAGNÓSTICO COLORIMÉTRICO

efeito de prova de conceito do biossensor biodegradável. Tendo isto em conta, bem como o trabalho desenvolvido por Mafalda Costa [33], adotou-se uma versão simplificada de um sistema de detecção enzimático com múltiplos indicadores. Como as concentrações fisiológicas de glucose sanguínea se encontram normalmente abaixo dos 20 mM, e como, segundo [33], o indicador AB é mais sensível para pequenas concentrações de glucose inferiores a 15 mM, decidiu-se utilizar apenas o indicador AB nos detetores colorimétricos, de modo a simplificar a interpretação da concentração de analito e do desempenho microfluídico do dispositivo.

Como estudado previamente, utilizou-se 0,5 μ L de solução AB e de solução enzimática, depositados na área de detecção. Para analisar a resposta colorimétrica do biossensor desenvolvido, utilizaram-se 6 soluções padrão de diferentes concentrações de glucose fisiologicamente relevantes. Na figura 4.27 é possível observar os resultados do sensor.

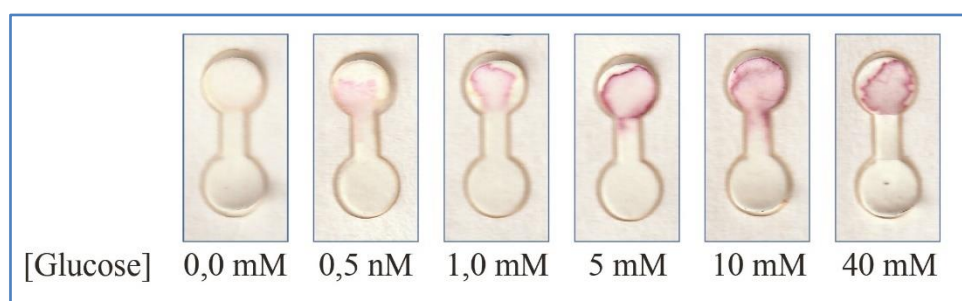


Figura 4.27 - Resultados digitalizados do sensor colorimétrico de glucose;

A detecção de glucose escolhida baseia-se na oxidação da glucose em ácido glucónico e peróxido de hidrogénio, através da enzima glucose oxidase, para posterior redução do peróxido de hidrogénio e oxidação do indicador, catalisada pela peroxidase. Conforme ocorre oxidação do indicador, verifica-se uma alteração da cor da solução proporcional à concentração de glucose. Em particular, o indicador AB produz uma alteração colorimétrica de transparente para magenta.

Verificou-se que a solução se conseguiu movimentar pelo canal de condução de uma área circular até à seguinte, misturando-se com os reagentes depositados. É visível também uma alteração colorimétrica em função da concentração de glucose, visivelmente crescente até aos 10 mM. A partir desta concentração, a resposta em intensidade à presença de analito estabiliza.

Os testes realizados foram digitalizados e analisados com o *software* de imagem ImageJ. Utilizou-se o valor de intensidade de cada canal RGB, subtraído do valor desse próprio canal para o ensaio com solução de glucose 0 mM, de modo a remover a contribuição do fundo. Os resultados encontram-se expostos na figura 4.28. Os pontos representam a média entre os 2 ensaios realizados para cada concentração, sendo que as barras de erro representam o desvio padrão entre os ensaios.

Observando o gráfico da figura 4.28, é possível constatar que os três canais RGB (vermelho, verde e azul) respondem de forma idêntica à concentração de glucose. Tendo isto em

CAPÍTULO 4: APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

conta, decidiu-se que um canal é suficiente para caracterizar a resposta colorimétrica do biossensor. Escolheu-se então a resposta do canal verde, pois é o canal com a maior amplitude de resposta em intensidade para as concentrações utilizadas. Observando a curva verde (*green*) do gráfico da figura 4.28, conclui-se que o indicador AB produz um rápido crescimento da intensidade colorimétrica para baixas concentrações de glucose e que, após os 10 mM, esta resposta em intensidade estabiliza.

Desta forma, mostrou-se que é possível a criação, com sucesso, de membranas adsorventes a partir de P(3HB) e a fixação nestas de um sistema de detecção de glucose enzimático.

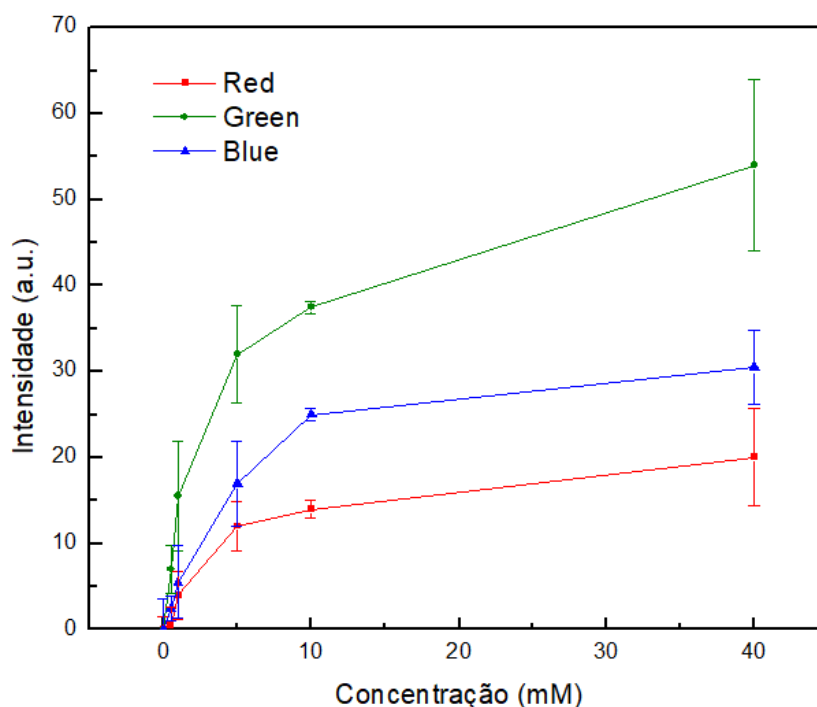


Figura 4.28 - Análise RGB da resposta do indicador AB para as diversas concentrações de glucose

CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Atualmente, as membranas poliméricas porosas atraem um interesse crescente da comunidade científica como fruto da sua aplicabilidade (real e potencial) em vários ramos da ciência dos materiais, por exemplo como substratos de baixa constante dielétrica, em microeletrônica, moldes para proliferação celular em engenharia de tecidos, suportes para catalisadores e reagentes em química e como membranas para processos de separação e filtração [60]. Para o propósito desta investigação, explorou-se a produção de membranas porosas como forma de criar dispositivos de fluxo lateral, capazes de devolver uma leitura colorimétrica na presença de glucose.

Foram realizados diversos testes de caracterização com os biopolímeros utilizados e com os dispositivos desenvolvidos. Foi possível concluir sobre a inabilidade de manipular P(3HB) de matérias primas oleosas com processos térmicos, devido ao desenvolvimento de uma coloração escura, prejudicial para o presente objetivo. Concluiu-se também sobre a dificuldade e sensibilidade do protocolo de produção de membranas por evaporação de solvente, que no caso da técnica de produção de membranas porosas por emulsão de água em clorofórmio resultou ou em morfologias muito porosas, imprevisíveis e heterogêneas, ou em morfologias previsíveis, contudo pouco porosas. Por fim, verificou-se ainda que o fracasso da técnica de lixiviação com sal na produção de membranas adsorventes se deve à hidrofobicidade do biopolímero. Desta forma, submeteram-se os canais de deteção ao tratamento de plasma de O_2 de forma a modificar a sua superfície e aumentar a sua molhabilidade.

Em suma, este trabalho permitiu o estudo preliminar de uma potencial aplicação de uma categoria de bioplásticos com propriedades muito especiais. Em particular, estudaram-se as propriedades dos polímeros P(3HB) obtido através de OAU, P(3HB) Biomer e P(3HB-co-HV) obtido a partir de polpa de maçã residual, no sentido de tornar possível o desenvolvimento de um biossensor colorimétrico de glucose biodegradável.

Através da combinação de duas técnicas de modificação de membranas poliméricas – lixiviação com sal e tratamento de plasma de O_2 –, criou-se estruturas porosas e adsorventes

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

capazes de transportar fluidos na sua matriz por ação capilar. Desta forma, mostrou-se que é possível a produção de membranas a partir de um biopolímero para utilização em dispositivos de diagnóstico rápido, mais especificamente em biossensores para deteção de glucose em soluções aquosas.

Esta investigação pode ser otimizada no sentido de tornar praticável a produção em grande escala de testes de diagnóstico rápido à base de biopolímeros biodegradáveis, colocando esta tecnologia à disposição da população, particularmente em regiões de baixos recursos.

Assim, sugerem-se as seguintes considerações para desenvolvimentos futuros:

- Utilização de métodos de extração do polímero que não envolvam solventes tóxicos, como é o caso do clorofórmio, de modo a reduzir o impacto ambiental do processo;
- Otimização do rácio de pó de NaCl para polímero, e da dimensão dos grãos do pó;
- Otimização do tempo de exposição ao tratamento de plasma;
- Estudo da degradação dos dispositivos a médio e longo prazo;
- Estudo de condições ideais de armazenamento dos dispositivos;

Aliando as técnicas descritas ao longo desta tese com desenvolvimentos futuros, seguindo as considerações sugeridas, acredita-se que será possível num futuro próximo criar dispositivos de diagnóstico rápido para diversos analitos e agentes patogénicos a partir de bioplásticos biodegradáveis.

BIBLIOGRAFIA

- [1] R. Geyer, J. R. Jambeck, and K. L. Law, "Production, use, and fate of all plastics ever made," *Sci. Adv.*, vol. 3, no. 7, p. e1700782, 2017.
- [2] A. Anjum, M. Zuber, K. M. Zia, A. Noreen, M. N. Anjum, and S. Tabasum, "Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 89, pp. 161–174, 2016.
- [3] M. N. Costa *et al.*, "A low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing: Lab-on-paper," *Nanotechnology*, vol. 25, no. 9, p. 094006, 2014.
- [4] S. Liu, W. Su, and X. Ding, "A Review on Microfluidic Paper-Based Analytical Devices for Glucose Detection," *Sensors (Basel)*, vol. 16, no. 12, p. 16(12):2086, 2016.
- [5] A. K. Yetisen, M. S. Akram, and C. R. Lowe, "Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices," *Lab Chip*, vol. 13, no. 12, p. 2210, 2013.
- [6] R. Toczyłowska-Mamińska, "Limits and perspectives of pulp and paper industry wastewater treatment – A review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 78, pp. 764–772, 2017.
- [7] A. Nič, M. Jirát, J. Košata, B. Jenkins, A. McNaught, "polymer," in *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, Research Triangle Park, NC: IUPAC, 2009.
- [8] A. Nič, M. Jirát, J. Košata, B. Jenkins, A. McNaught, "macromolecule (polymer molecule)," in *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, Research Triangle Park, NC: IUPAC, 2009.
- [9] M. G. Rao, P. Bharathi, and R. M. Akila, "A Comprehensive Review on Biopolymers," vol. 4, no. 2, pp. 61–68, 2014.
- [10] G. I. Kuta, Mukti Gill, R. Shanks, and G. Wypych, "Bioplastic: a Better Alternative To Plastics," *IMPACT Int. J. Res. Applied, Nat. Soc. Sci.*, vol. 2, no. 8, p. 693, 2004.
- [11] K. B. Anish, S. Gulab, K. A. Neeraj, G. Varsha, and Y. Anita, "Isolation and screening of Polyhydroxybutyrates producing bacteria from pulp, paper, and cardboard industry wastes," *Int J Biomat.*, vol. 2013, no. Article ID 752821, p. 10, 2013.
- [12] I. Roy and P. M. Visakh, *Polyhydroxyalkanoate (PHA) Based Blends, Composites and Nanocomposites*. The Royal Society of Chemistry, 2014.
- [13] M. Koller, "Advances in Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production," *Bioengineering*, vol. 4, no. 4, p. 88, 2017.
- [14] S. Khanna and A. K. Srivastava, "Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates," *Minerva Biotechnol.*, vol. 40, no. 1, pp. 607–619, 2004.
- [15] C. Kourmentza *et al.*, "Recent Advances and Challenges towards Sustainable

CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFIA

- Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production,” *Bioengineering*, vol. 4, no. 2, p. 55, 2017.
- [16] S. Chanprateep, “Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 110, no. 6, pp. 621–632, 2010.
- [17] C. S. S. Oliveira, C. E. Silva, G. Carvalho, and M. A. Reis, “Strategies for efficiently selecting PHA producing mixed microbial cultures using complex feedstocks: Feast and famine regime and uncoupled carbon and nitrogen availabilities,” *N. Biotechnol.*, vol. 37, pp. 69–79, 2017.
- [18] M. Proença, “Production of polyhydroxyalkanoates from oil-containing substrates,” Universidade Nova De Lisboa, 2015.
- [19] M. Lemoigne, “Products of dehydration and of polymerization of β -hydroxybutyric acid,” *Bull. Soc. Chim. Biol.*, vol. 8, pp. 770–782, 1926.
- [20] X. Huang, *Bioresorbable Materials and Their Application in Electronics*. Cambridge University Press, 2017.
- [21] K. Sudesh, H. Abe, and Y. Doi, “Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 25, no. 10, pp. 1503–1555, 2000.
- [22] E. A. Dawes and P. J. Senior, “The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Micro-organisms,” *Adv. Microb. Physiol.*, vol. 10, no. C, pp. 135–266, 1973.
- [23] J. M. Jeon *et al.*, “Application of acetyl-CoA acetyltransferase (AtoAD) in *Escherichia coli* to increase 3-hydroxyvalerate fraction in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate),” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 40, no. 5, pp. 781–789, 2017.
- [24] T. M. Squires and S. R. Quake, “Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale,” *Rev. Mod. Phys.*, vol. 77, no. 3, pp. 977–1026, 2005.
- [25] G. M. Whitesides, “The origins and the future of microfluidics,” *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 368–373, 2006.
- [26] P. J. Pritchard and J. C. Leylegian, *Fox and McDonald’s introduction to fluid mechanics*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2011.
- [27] A. Manz *et al.*, “Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems. Capillary electrophoresis on a chip,” *J. Chromatogr. A*, vol. 593, no. 1–2, pp. 253–258, 1992.
- [28] S. Vyawahare, A. D. Griffiths, and C. A. Merten, “Miniaturization and parallelization of biological and chemical assays in microfluidic devices,” *Chem. Biol.*, vol. 17, no. 10, pp. 1052–1065, 2010.
- [29] A. P. F. Turner, “Biosensors - Sense and sensitivity,” *Science*, vol. 290, no. 5495, pp. 1315–1317, 2000.

- [30] E. H. Yoo and S. Y. Lee, "Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice," *Sensors*, vol. 10, no. 5, pp. 4558–4576, 2010.
- [31] "Blood Glucose Monitoring - National Library of Medicine - PubMed Health." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0024698/>. [Accessed: 17-Aug-2018].
- [32] A. L. Galant, R. C. Kaufman, and J. D. Wilson, "Glucose : Detection and analysis," *Food Chem.*, vol. 188, pp. 149–160, 2015.
- [33] M. Q. do N. Costa, "Desenvolvimento de Microfluídica em Papel para Utilização em Biossensores," p. 99, 2012.
- [34] K. Zhao, Y. Deng, J. C. Chen, and G. Q. Chen, "Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility," *Biomaterials*, vol. 24, no. 6, pp. 1041–1045, 2003.
- [35] H. M. Chang *et al.*, "Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)-based scaffolds for tissue engineering," *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, vol. 47, no. 7, pp. 533–539, 2014.
- [36] Y. S. Cho *et al.*, "Assessments for bone regeneration using the polycaprolactone SLUP (salt-leaching using powder) scaffold," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 105, no. 12, pp. 3432–3444, 2017.
- [37] Y. S. Cho, B. S. Kim, H. K. You, and Y. S. Cho, "A novel technique for scaffold fabrication: SLUP (salt leaching using powder)," *Curr. Appl. Phys.*, vol. 14, no. 3, pp. 371–377, 2014.
- [38] S. A. Mirmohammadi, M. T. Khorasani, H. Mirzadeh, and S. Irani, "Investigation of Plasma Treatment on Poly(3-hydroxybutyrate) Film Surface: Characterization and Invitro Assay," *Polym. Plast. Technol. Eng.*, vol. 51, no. 13, pp. 1319–1326, Sep. 2012.
- [39] T. Hatakeyama and F. X. Quinn, *Thermal Analysis — Fundamentals and Applications to Polymer Science*, 2nd ed. Kluwer Academic Publishers, 1996.
- [40] C. Schick, "Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 395, no. 6, pp. 1589–1611, 2009.
- [41] B. D. Cullity, *Elements of X-Ray Diffraction*. Addison-Wesley Longman, Inc., 1978.
- [42] J. Bernstein, G. R. Desiraju, and I. Hargittai, *The Basics of Crystallography and Diffraction Third Edition*, vol. 20, no. 4. Oxford University Press, 2009.
- [43] L. J. Poppe, V. F. Paskevich, J. C. Hathaway, and D. S. Blackwood, "A laboratory manual for X-ray powder diffraction," no. January 2001, pp. 1–88, 2001.
- [44] P. J. Goodhew, J. Humphreys, and R. Beanland, *Electron microscopy and analysis*. CRC Press, 2001.
- [45] K. D. Vernon-Parry, "Scanning electron microscopy: an introduction," *III-Vs Rev.*, vol.

CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFIA

- 13, no. 4, pp. 40–44, 2000.
- [46] P. A Webb, “An Introduction To The Physical Characterization of Materials by Mercury Intrusion Porosimetry with Emphasis On Reduction And Presentation of Experimental Data,” *Pharm Online*, no. January, p. 23, 2001.
- [47] L. P. De Meneses, “Evaluation of sub-, supercritical fluids as solvents for extraction and impregnation of polyhydroxyalkanoates,” Universidade Nova de Lisboa, 2017.
- [48] J. Możejko-Ciesielska and R. Kiewisz, “Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?,” *Microbiol. Res.*, vol. 192, pp. 271–282, 2016.
- [49] C. G. Simon, “Scaffold Fabrication Tutorial: Salt-Leaching & Gas Foamed Scaffolds SALT-LEACHED,” 2009.
- [50] J. R. Vig, “UV/ozone cleaning of surfaces,” *J. Vac. Sci. Technol.*, vol. 3, no. 3, pp. 1027–1034, 1985.
- [51] A. Anjum, M. Zuber, K. M. Zia, A. Noreen, M. N. Anjum, and S. Tabasum, “Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 89, pp. 161–174, 2016.
- [52] M. V. Cruz *et al.*, “Production of polyhydroxyalkanoates from spent coffee grounds oil obtained by supercritical fluid extraction technology,” *Bioresour. Technol.*, vol. 157, pp. 360–363, 2014.
- [53] B. Laycock, P. Halley, S. Pratt, A. Werker, and P. Lant, “The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 39, no. 2, pp. 397–442, 2013.
- [54] E. Bugnicourt, P. Cinelli, A. Lazzeri, and V. Alvarez, “Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging,” *Express Polym. Lett.*, vol. 8, no. 11, pp. 791–808, 2014.
- [55] I. P. Dobrovol'skaya, N. L. Kuz'mina, B. L. Biber, I. M. Stark, and Z. Y. Chereiskii, “Supramolecular structure of films based on poly-B-hydroxybutyrate,” *Fibre Chem.*, vol. 24, no. 5, pp. 357–359, 1993.
- [56] Y. Kawaguchi and Y. Doi, “Structure of native poly(3-hydroxybutyrate) granules characterized by X-ray diffraction,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 70, no. 2, pp. 151–155, 1990.
- [57] R. C. Rodrigues, M. L. Fiorese, E. P. Arnosti, R. A. W. Ramos, A. P. T. Piezzin, and G. M. F. Aragão, “Produção e caracterização de poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Ralstonia eutropha* utilizando resíduo da indústria de arroz,” *Rev. Matéria*, vol. 9, no. 4, pp. 378–385, 2004.
- [58] U. K. Ibrahim, R. M. Salleh, and W. Zhou, “Radiation Heat Transfer Analysis in High Emissivity Baking Oven Using Network Representation Method,” *APCBEE Procedia*,

- vol. 3, pp. 11–16, 2012.
- [59] M. Sun, P. Zhou, L. F. Pan, S. Liu, and H. X. Yang, “Enhanced cell affinity of the silk fibroin- modified PHBHHx material,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 20, no. 8, pp. 1743–1751, 2009.
 - [60] S. D. Kimmins and N. R. Cameron, “Functional porous polymers by emulsion templating: Recent advances,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 21, no. 2, pp. 211–225, 2011.
 - [61] H. Zhang and A. I. Cooper, “Synthesis and applications of emulsion-templated porous materials,” *Soft Matter*, vol. 1, no. 2, pp. 107–113, 2005.
 - [62] M. S. Silverstein, “Emulsion-templated porous polymers: A retrospective perspective,” *Polym. (United Kingdom)*, vol. 55, no. 1, pp. 304–320, 2014.
 - [63] A. J. Gonçalves Ribeiro, “Desenvolvimento de testes de diagnóstico utilizando tecnologia lab-on-paper,” Universidade Nova de Lisboa, 2015.
 - [64] T. Desmet *et al.*, “Nonthermal Plasma Technology as a Versatile Strategy for Polymeric Biomaterials Surface Modification: A Review,” *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 9, pp. 2351–2378, 2009.
 - [65] Diener electronic, “Plasma Technology,” 2007. [Online]. Available: http://pdf.directindustry.com/pdf/diener-electronic/plasma-technology-diener-electronic/50802-410101-_2.html. [Accessed: 22-Aug-2018].